

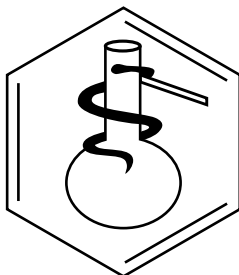
*Facultad de Ciencias
Sede Bogotá*



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia



REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICO-FARMACÉUTICAS
Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
ISSN 0034-7418, Fax: 3165060, Cra. 30 No. 45-03, Bogotá, D. C., Colombia.
Correo electrónico: rcquifja_fcbog@unal.edu.co
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcquifja>
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0034-7418&rep=
<https://scholar.google.com/citations?user=TuBT68sAAAAJ&hl=es>

Rectora Universidad Nacional de Colombia: Dolly Montoya Castaño, Ph. D.
Vicerrector sede Bogotá: José Ismael Peña Reyes, Ph. D.
Decana Facultad de Ciencias: Martha Raquel Fontanilla Duque, Ph. D.
Director Departamento de Farmacia: Jesús Becerra Camargo, Ph. D.
Directora Área Curricular de Farmacia: Bibiana Margarita Rosa Vallejo Díaz, Ph. D.

Director-Editor Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas:
Fleming Martínez Rodríguez, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, correo electrónico: fmartinezr@unal.edu.co

Comité Científico:

Alejandro Sosnik, Ph. D., Department of Materials Science and Engineering, Israel Institute of Technology (Technion), Haifa, Israel.
Carlos Bregni, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Juan M. Irache, Ph. D., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, España.
Juan R. Perilla, Ph. D., Department of Chemistry and Biochemistry, College of Arts and Sciences, University of Delaware, Newark, Delaware, U.S.A.
Mario F. Guerrero, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Mario G. de Carvalho, Ph. D., Departamento de Farmácia, Instituto de Ciências Naturais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.
Martha R. Fontanilla, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Rubén H. Manzo, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
Victor Romanowski, Ph. D., Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
William E. Acree, Jr., Ph. D., Department of Chemistry, University of North Texas, Denton, Texas, U.S.A.

Comité Editorial:

Abolghasem Jouyban, Ph. D., Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Álvaro F. Jiménez-Kairuz, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
Daniel R. Delgado, Ph. D., Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.
Diego A. Chiappetta, Ph. D., Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Fernão Castro Braga, Ph. D., Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
Maria A. Peña, Ph. D., Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.
Marta Concheiro, Ph. D., National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.
Paulo R. de Oliveira, Ph. D., Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro, Brasil.

Evaluadores:

Berkant Kayan, Ph. D., Department of Chemistry, Arts and Sciences Faculty, Aksaray University, Aksaray, Turkey
Carlos A. Calderón, Ph. D., Unidad de Farmacología, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá D. C., Colombia
Christian Hocht, Ph. D., Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina
Daniel R. Delgado, Ph. D., Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva, Colombia.
Daniela Toro, Esp., Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Adventista, Medellín, Colombia.
Dario A. Tinjaci, Ph. D., Facultad de Ciencias, Universidad El Bosque, Bogotá D. C., Colombia.
Diana M. Galindres, Ph. D., Departamento de Química, Fundación Universidad de América, Bogotá D. C., Colombia
Edgar F. Vargas, Ph. D., Departamento de Química, Universidad de los Andes, Bogotá D. C., Colombia.
Eduardo Lagomarsino, Ph. D., Cátedra de Farmacia Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Fleming Martínez, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Jorge E. Hernández, Ph. D., Programa de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia
José J. López, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Luis F. Ospina, Ph. D., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Mahmut Erzençin, Ph. D., Department of Chemistry, Arts and Sciences Faculty, Aksaray University, Aksaray, Turkey
Máximo A. Rodríguez, M. Sc., Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.
Olga E. García, Ph. D. (C), Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Adventista, Medellín, Colombia.
Paulo R. Barros-Gomes, M. Sc., Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Campus Abaetetuba, Brasil.

Asistente editorial: Anyeli A. Rivera, B. A.

Edición, armada electrónica e impresión: Procceditor Ltda., Bogotá.

Teléfono: 757 9200. Fax: ext. 102.

Correo electrónico: procceditor@yahoo.es

MISIÓN

La *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* es un órgano de difusión en el cual se publican investigaciones científicas, comunicaciones técnicas y revisiones temáticas originales en las áreas de las ciencias farmacéuticas (véanse Normas para publicación). La revista está destinada principalmente a químicos farmacéuticos, químicos, ingenieros químicos, médicos cirujanos, médicos veterinarios, y a otros profesionales de las ciencias físicas y naturales, de la ingeniería y de las profesiones sanitarias relacionadas con el uso de medicamentos.

VISIÓN

En pro de la difusión de las investigaciones, los contenidos de la *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* son de acceso libre, con ello se espera llegar a un número mayor de lectores, propiciando la consolidación de comunidades académicas. Además, se proyecta que los contenidos publicados contribuyan al desarrollo e innovación de las ciencias farmacéuticas.

ÉTICA

La responsabilidad de lo expresado en cada artículo es exclusiva de los autores y no representa ni compromete posiciones de la revista ni del cuerpo editorial. Los contenidos publicados pueden reproducirse siempre que se cite la fuente respectiva. Esta revista sigue los lineamientos del COPE (Committee on Publication Ethics), que pueden ser consultados en <http://publicationethics.org/>

LICENCIA CREATIVE COMMONS



Todo el contenido de esta revista, excepto donde está identificado, está bajo una Licencia Creative Commons de atribución aprobada en Colombia. Consulte la normativa en http://co.creativecommons.org/?page_id=13
La totalidad de los números anteriores se encuentran disponibles en el sitio web: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcquifja>

Contenido

Pharmacotechnical development and characterization of gel based on <i>Anacardium occidentale</i> L.	
Daniella Isla Medeiros Dantas, Toshiyuki Nagashima Junior	4
Therapeutic role of medicinal plants against viral diseases focusing on COVID-19: Application of computational chemistry towards drug design	
Fatemeh Mollaamin, Sara Shahriari, Majid Monajjemi	19
El uso de anticuerpos monoclonales en dermatología	
Laura Estela Castrillón Rivera, Alejandro Palma Ramos, Jorge Ismael Castañeda Sánchez	44
Water quality and health risk assessment of metals within the vicinity of Gosa dumpsite, Abuja Nigeria	
Joseph Omada , Emeka Chima Ogoko, Henrietta Kelle, Gideon Yomi	67
A descrição teórica da detecção eletroanalítica do ledol em méis, assistida pelo compósito do polímero condutor com o oxihidróxido de cobalto	
Volodymyr V. Tkach, Marta V. Kushnir, Nataliia M. Storoshchuk, Olga V. Luganska, Vira V. Kopyika, Nataliia V. Novosad, Svitlana M. Lukanova, Yana G. Ivanushko, Valentyna G. Ostapchuk, Svitlana P. Melnychuk, Petro I. Yagodynets', Sílvio C. de Oliveira, José I. Ferrão de Paiva Martins, Maria João Monteiro, Zholt O. Kormosh, Tetiana V. Morozova	101
Estado de metilación de regiones promotoras de tres genes de respuesta inflamatoria en una muestra de colombianos con problemas de consumo de alcohol: un estudio exploratorio	
Mauricio Rey Buitrago, Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez	114
Ambientadores antihumedad y antitabaco: desarrollo de fragancias	
Angélica Sánchez Díaz, Lianelys Nazario Ladrón de Guevara, Mirna Fernández Cervera	145
Estudio de la estabilidad física, química y microbiológica de una preparación extemporánea a base de maleato de enalapril	
Javier Enrique Ariza Paba, Bibiana Margarita Vallejo Díaz, Clara Eugenia Plazas Bonilla, Helber de Jesús Barbosa Barbosa	164
Organic salts as a tool for pharmaceutical ingredient purification: Bibliographic review	
Juan Carlos Ortiz Lara	184
Preferential solvation of triclocarban in <i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone + water cosolvent mixtures according to the Inverse Kirkwood-Buff Integrals (IKBI) method and correlation of solubility by means of some mathematical models	
Cristhian Andrés Muñoz-Ortiz, Néstor Enrique Cerquera, Jennifer Katusca Castro Camacho, Jhonny Osorio-Gallego, Rossember Edén Cárdenas-Torres, Mauricio Herrera, Daniel Ricardo Delgado	219
Preparation and characterization of copper nanoparticles of <i>Schisandra chinensis</i> and evaluation of its antiproliferative activity	
Dario A. Tinjacá, Ovidio A. Almanza, Felix Delgado, Sandra Johana Morantes, María C. Medina, Paola Torres, Estefanía Martínez	244
Aptitud y conocimiento sobre Medicamentos de Venta Libre en Colombia: un análisis de la automedicación responsable	
Marcia Andrea Yucuma-Guzmán, Julián David Castañeda-Muñoz, Fredy Angarita-Reina, Claudia Lorena García Rojas, Henry Rubiano Daza	266
Normas para publicación	282

Pharmacotechnical development and characterization of gel based on *Anacardium occidentale* L.

Daniella Isla Medeiros Dantas, Toshiyuki Nagashima Junior*

Federal University of Campina Grande, Olho d'água da Bica s/n - Cuité/PB, Brazil

*Corresponding author: nagashima@ufcg.edu.br

Received: May 24, 2023

Corrected: December 2, 2023

Accepted: December 11, 2023

SUMMARY

Introduction: Among the many plants used in folk medicine, *Anacardium occidentale* L. stands out as a plant belonging to the Anacardiaceae family, commonly known as cashew tree. Several pharmacological properties are known, such as anti-tussive, antisyphilitic, diuretic, wound-healing, and antimicrobial actions. The stem bark is attributed with various pharmacological actions, with notable emphasis on its wound-healing activity. **Objective:** The present study aimed to develop a gel containing *Anacardium occidentale* L. glycolic extract with wound-healing activity, evaluating its physicochemical and microbiological characterization. **Materials and methods:** Two gels, Gel 1 and Gel 2, were prepared, composed of Carbopol® 940, propylene glycol, glycerin, EDTA, nipagin, with the glycolic extract of *Anacardium occidentale* L. incorporated into the gel base. The gels were evaluated on days 1, 20, 25, and 35. The physicochemical quality control was conducted by determining the pH and verifying physical and visual aspects, such as changes in color or precipitation, and spreadability test. **Results:** The formulations presented pH values between 6.0 and 8.0, respectively, normal and homogeneous appearance, and characteristic odor, with attention drawn to the color change in Gel 2 after 20 days of study. Gel 2 exhibited superior and more homogeneous spreadability. Regarding the viable microbial count assay, conducted for microbiological quality control, it was confirmed that the formulations were within acceptable microbial limits. **Conclusion:** Based on the results of this study, the formulations demonstrated acceptable physicochemical and microbiological characteristics, ruling out the need for reformulation.

Keywords: Wound healing, Cashew tree, *Anacardium occidentale* L. Gel.

RESUMEN

Desarrollo farmacotécnico y caracterización de un gel a base de *Anacardium occidentale* L.

Introducción: Entre las muchas plantas utilizadas en la medicina popular, *Anacardium occidentale* L. destaca como una planta perteneciente a la familia Anacardiaceae, comúnmente conocida como árbol de anacardo. Se conocen varias propiedades farmacológicas, como acciones antitusivas, antisifilíticas, diuréticas, cicatrizantes y antimicrobianas. A la corteza del tallo se le atribuyen diversas acciones farmacológicas, con énfasis notable en su actividad cicatrizante. **Objetivo:** El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un gel que contenga extracto glicólico de *Anacardium occidentale* L. con actividad cicatrizante, evaluando su caracterización fisicoquímica y microbiológica. **Materiales y métodos:** Se prepararon dos geles, Gel 1 y Gel2, compuestos por Carbopol[®] 940, propilenglicol, glicerina, EDTA, nipagin, con el extracto glicólico de *Anacardium occidentale* L. incorporado en la base del gel. Los geles se evaluaron en los días 1, 20, 25 y 35. El control de calidad fisicoquímico se llevó a cabo mediante la determinación del pH y la verificación de aspectos físicos y visuales, como cambios de color o precipitación, y la prueba de esparcimiento. **Resultados:** Las formulaciones presentaron valores de pH entre 6,0 y 8,0, respectivamente, apariencia normal y homogénea, y olor característico, prestando atención al cambio de color en el Gel2 después de 20 días de estudio. El Gel 2 mostró una esparcibilidad superior y más homogénea. En cuanto al ensayo de recuento microbiano viable, realizado para el control de calidad microbiológica, se confirmó que las formulaciones se encontraban dentro de los límites microbianos aceptables. **Conclusiones:** Basándonos en los resultados de este estudio, las formulaciones demostraron características fisicoquímicas y microbiológicas aceptables, descartando la necesidad de reformulación.

Palabras clave: Cicatrización de heridas, árbol de anacardo, gel de *Anacardium occidentale* L.

RESUMO

Desenvolvimento farmacotécnico e caracterização de gel à base de *Anacardium occidentale* L.

Resumo: Dentre as muitas plantas utilizadas na medicina popular, destaca-se *Anacardium occidentale* L., pertencente à família Anacardiaceae, comumente conhecida como cajueiro. São conhecidas diversas propriedades farmacológicas, tais como ação antitussígena, anti-sifilítica, diurética, cicatrizante e antimicrobiana. A casca do caule é atribuída a diversas ações farmacológicas, com destaque para sua atividade cicatrizante. **Objetivos:** O presente estudo teve como objetivo desenvolver um gel contendo extrato glicólico de *Anacardium occidentale* L. com atividade cicatrizante, avaliando sua caracterização físico-química e microbiológica. **Materiais e métodos:** Dois géis, Gel 1 e Gel 2 foram preparados, compostos por Carbopol[®] 940, propilenoglicol, glicerina, EDTA, nipagin, com o extrato glicólico de *Anacardium occidentale* L. incorporado à base do gel. Os géis foram avaliados nos dias 1, 20, 25 e 35. O controle de qualidade físico-químico foi realizado através da determinação do pH e verificação de aspectos físicos e visuais, como alterações de cor ou precipitação, além do teste de espalhabilidade. Resultados: As formulações apresentaram valores de pH entre 6,0 e 8,0, respectivamente, aparência normal e homogênea, e odor característico, com atenção voltada para a alteração de cor do Gel 2 após 20 dias de estudo. O Gel 2 apresentou espalhabilidade superior e mais homogênea. Em relação ao ensaio de contagem microbiana viável, realizado para controle de qualidade microbiológica, confirmou-se que as formulações estavam dentro dos limites microbianos aceitáveis. Conclusão: Com base nos resultados deste estudo, as formulações demonstraram características físico-químicas e microbiológicas aceitáveis, não havendo necessidade de reformulação.

Palavras chave: Cicatrização de feridas, Cajueiro, Gel de *Anacardium occidentale* L.

INTRODUCTION

Anacardium occidentale L., a perennial plant belonging to the Anacardiaceae family, is commonly known as cashew tree [1]. Native to the northeastern region of Brazil, this plant thrives in regions ranging from sea level to an altitude of 1,000 m. It has expanded into South American countries, was introduced to India and Africa by the Portuguese, and has spread throughout Southeast Asia [1, 2].

Several pharmacological studies have demonstrated the potential of the genus, particularly in terms of its anti-inflammatory activity [3], wound healing properties [4], antifungal effects [5], and broad-spectrum antimicrobial activity [6]. These pharmacological effects have been associated with the presence of metabolites such as flavonoids, terpenes, steroids, xanthenes, and primarily phenolic lipids and derivatives, as well as saponins and essential oils. Additionally, carbohydrates, tannins, catechins, glycosides, resins, alkaloids, and sterols have also been identified in association with these pharmacological effects [7].

In addition to driving the food industry by providing raw materials for the juice and cashew nut-derived products [1], The *Anacardium occidentale* L, with the application of new technologies, stands out as an important source for the extraction of phytotherapeutics and other compounds, thus offering greater opportunities, scientific progress, and technological development to the region and the country. Isolated compounds from the cashew tree have been associated with wound healing activity [4], gastro-protective effects, anti-inflammatory activity, antimicrobial properties, and analgesic effects [8, 9]. Therefore, the literature highlights several procedures involving the use of *A. occidentale* for improving the wound healing process and maintaining cutaneous-membrane integrity.

Wound healing is a complex process. Wound dressings are therapeutic tools that aid in the healing of skin injuries and wounds. Among the numerous studied practices involving dressings, the use of gel has proven to be highly effective due to its hydroactive properties, low cost, and simple and safe manufacturing process [10, 11]. In order to enhance the overall functions of dressings, the incorporation of bioactives, drugs, nanoparticles, and/or other wound healing enhancers has been investigated. These can be incorporated into polymeric matrix wound dressings primarily to improve the quality and accelerate the healing of lesions [11].

Among the pharmacologically active parts of the cashew tree, the bark deserves attention as it is used as an astringent, tonic in various asthenias, appetite stimulant, abortifacient, contraceptive, vaginal antiseptic, and effective in the treatment of aphthae, asthma, bronchitis, intestinal colic, muscle weakness, diabetes, diarrhea, dysentery, skin diseases, sterility, fever, hypertension, throat inflammation, leishmaniasis, malaria, burns, syphilis, cough, peptic ulcer, impotence, genital problems, wound healing activity, gastroprotective activity, among others [12, 13].

The use of natural extract from *A. occidentale* is considered a great promise in the biomedical field. It is abundantly found in nature and easily available in the market. It is popularly known for its wound healing, antibacterial, anti-inflammatory, and anti-

oxidant properties. Therefore, considering the reports on the various pharmacological actions of cashew bark and the characteristics of the wound healing process, the present thesis aims to develop a gel formulation containing *A. occidentale* extract for wound healing, thus contributing to new alternatives in wound treatment and biotechnological development.

The primary goal of this study was to develop a gel formulation containing cashew tree glycolic extract, aiming at the wound healing action described in the literature, in order to provide benefits and treatment alternatives for society.

METHODS

Cashew tree bark collection

The sample of the barks were obtained by collecting a sawn branch of the *A. occidentale* plant at Gamelões site (Figure 1), located in Cuité-PB municipality, on February 20th.



Figure 1: Species of *A. occidentale*, Cuité-PB.

The branch was cleaned with soap and water to remove residues and contaminants, and the barks were then removed using a machete. The barks were subjected to a drying process in a circulating air oven at 28 °C for two days, and subsequently, they were ground into powder using a knife mill resulting in 138 g of powder.

Preparation of *A. occidentale* glycolic extract

The obtained powder from *A. occidentale* bark was added to a wide-mouthed flask. Separately, in a graduated cylinder, the 50% water/ethanol solution containing propylene glycol (VETEC) was prepared according to Table 1. The solution was added to the flask containing the *A. occidentale* powder, and maceration was carried out for eight

days with alternating agitation. At the end of maceration, filtration was performed using a Buchner funnel, a Kitasato flask, and filter paper with the aid of a vacuum pump (Prismatec 131). The amount of solution (50% hydroalcoholic solution + propylene glycol) specified in the Brazilian Pharmacopoeia Formulary, 2011, was passed over the filtered extract. After filtration, the plant material was subjected to maceration again for eight days, followed by filtration. The extracts from both macerations were mixed at the end of the process.

Table 1. Composition of glycolic extract of *A. occidentale*.

Components	Amount
Powder from the bark of <i>A. occidentale</i>	138 g
propylene glycol	13.79 mL
Water/Ethanol (1:1)	258 mL

Preparation of *A. occidentale* gel

Table 2 presents the components used for the formulation preparation and their respective functions. Two gel formulations with Carbopol® 940 (Carbomer 940) as the base were prepared, containing glycerin, propylene glycol, EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid), nipagin (methylparaben), and triethanolamine in their formula. Table 2 describes the composition of the gels containing different amount of *A. occidentale* glycolic extract.

Table 2. Composition of healing gel from *Anacardium occidentale L.*

Components	Gel 1	Gel 2
Carbopol	1.5 g	1.5 g
Glycerin	7.5 g	7.5 g
EDTA	0.15 g	0.15 g
Propylene glycol	4.05 g	4.05 g
Nipagin	0.3 g	0.3 g
Triethanolamine	q.s.p	q.s.p
<i>Anacardium occidentale L</i> extract	4 g	8 g
Water	133 g	129 g

After weighing all the components of the base gel formulation, manipulation was carried out as follows: Phase A consisted of propylene glycol and nipagin, with nipagin

dissolved in propylene glycol. Phase B consisted of EDTA and glycerin, with EDTA dissolved in water and dispersed in glycerin. Subsequently, Phase A was incorporated into Phase B.

The Carbopol was pulverized, dissolved in the resulting mixture of Phase A+B, and set aside for 24 hours to allow polymer hydration. After that, triethanolamine was added with agitation. In the next step, the incorporation of *A. occidentale* L. extract into the gel base was performed, and the pH was checked and adjusted.

Physical-chemical quality control

The gel samples were evaluated on days 1, 20, 25, and 35, and certain parameters such as pH, color change, and precipitation were observed. pH determination was performed using indicator strips (MQuant®), while parameters such as color change and precipitation were assessed through visual analysis.

Determination of spreadability

To determine the spreadability, a technique proposed by Knorst was used [14], which involves using glass plates on a millimeter paper scale to determine the surface area covered by the sample by measuring the perpendicular diameters and subsequently calculating the mean diameter. One gram of the sample was placed in the central space of the plate, and then a glass plate of known weight was placed on top of the sample. After three minutes, the diameters covered by the sample in a horizontal position were measured using the millimeter paper, and the mean diameter was calculated. This procedure was repeated by incrementally adding weights of 250 g, 500 g, and 750 g at three-minute intervals from one weight to another. This spreadability assay were conducted at room temperature, which was maintained between 21 – 25 °C

The spreadability of the samples was determined based on the added weight, according to: $Ei = (d^2 \times \pi)/4$, where: Ei is the spreadability of the sample for a specific weight in square millimeters (mm²) and d is the mean diameter in millimeters (mm) [15]. The procedure was performed in triplicate for gel 1 and gel 2, and the mean and standard deviation were calculated.

Microbiological control

Microbiological control was performed through the viable microbial count assay. In the assay, 1 mL of each sample diluted in universal neutralizer was used. The analyses for each dilution were carried out in duplicate. The samples were seeded in depth (Pour Plate) for the enumeration of bacteria and fungi, respectively. The viable microbial count assay involves counting the population of microorganisms that show visible growth

within 5 days on Casein-Soy Agar at $32.5 (\pm 2.5) ^\circ\text{C}$ and within 7 days on Sabouraud Dextrose Agar at $22.5 (\pm 2.5) ^\circ\text{C}$ for bacteria and fungi counting, respectively [16].

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical quality control

Organoleptic characteristics

The organoleptic characteristics were analyzed in terms of appearance, color, and odor. In the evaluation of appearance, visual observation was made to determine if any changes occurred in the analyzed formulations, such as phase separation and formulation precipitation. Color analysis was performed visually, while odor evaluation was conducted directly through olfaction [17].

As a result, the gel formulations containing the *A. occidentale* glycolic extract showed positive results, exhibiting a homogeneous appearance and pleasant odor. Gel 2 only exhibited a slight color alteration, acquiring a darker shade after 20 days of the study. However, this change indicates that it is not due to instability but rather the interaction between the glycolic extract and the formulation during the study. The appearances of the gels remained unchanged throughout the testing period, with no observed phase separation or component separation, clumping, or precipitation (Figure 2). Similarly, no odor modification was observed at the end of the study, as the samples retained their characteristic odor. These data indicate that the formulation demonstrated a good ability to interact with the *A. occidentale* glycolic extract, which was confirmed by monitoring the physicochemical characteristics of the samples under the three evaluated conditions.

The formulations did not exhibit phenomena such as precipitation, syneresis, or phase separation, and their appearance was considered normal without any changes. In the formulation of gel 2, a change in color was observed, shifting from a reddish hue to a brownish color, as shown in Figure 3.

Sing *et al.* (2007) developed three herbal gels using three different polymeric bases: Carbopol[®], carboxymethyl cellulose (CMC), and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), and monitored their stability. The stability study conducted on the three different formulations yielded different and relevant results at the end of the study. The authors observed a significant decrease in the pH of the CMC gel, along with a change in physical appearance, resulting in a loss of semi-solid consistency. Physical changes were also observed in the HPMC gel. Variations in color, appearing darker, were observed in the Carbopol[®] and

HPMC gels. Based on these results, the authors selected the Carbopol® gel as the most stable for the development of herbal formulations.

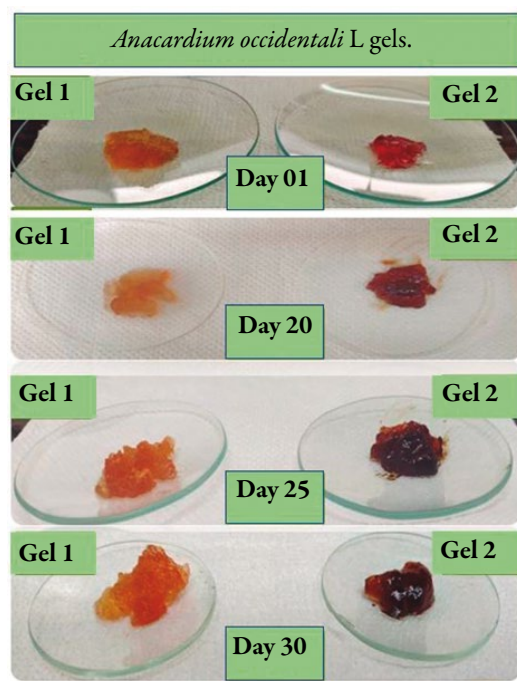


Figure 2. Gels containing *A. occidentale* extract and the analysis of day 1, 20, 25 and 35.



Figure 3. Aspect of Gel 2 on the 1st and 20th day

The color and odor variations in herbal formulations may not be considered significant, as high temperature can interfere with the organoleptic characteristics of semi-solid formulations. Therefore, it is necessary to provide guidance to the patients regarding temperature and appropriate storage conditions based on the type of formulation [18].

pH determination

The pH values determined using indicator strips on days 1, 20, 25, and 35 are presented in Table 3.

Table 3. pH values on days 1, 20, 25, 35 of Gel 1 and Gel 2.

Gel	pH	Day
1	6.0	1
	6.0	20
	6.0	25
	6.0	35
2	9.0	1
	8.0	20
	8.0	25
	8.0	35

The pH of a formulation is standardized based on the stability pH range of active components and the biological tolerance range for topical products (5.5 to 8.0). The gel formulations developed in this research showed a pH compatible with the skin (6.0 and 8.0, respectively) and no significant changes were observed at the end of the study.

The determination of pH is a critical factor in the study of stability, as changes in pH value can occur due to various factors such as impurities, hydrolysis, decomposition, and process error. These instabilities can also occur due to storage time and/or improper transportation and storage conditions [19].

Spreadability determination

Figures 4 and 5 present the results of gel spreadability expressed in mm², showing the spreadability indices (y) and the weights applied to the sample (x). This test aimed to evaluate the time taken for the formulation to spread over the applied surface, thus identifying any changes in the product's consistency.

By observing Figures 4 and 5, it is possible to evaluate that gel 2 exhibited superior spreadability, with a more homogeneous distribution and a low standard deviation when compared to gel 1.

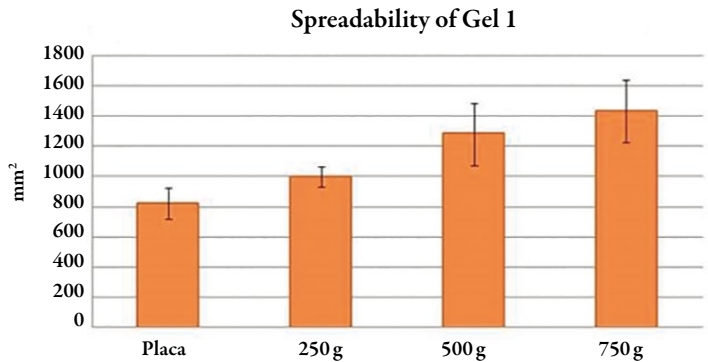


Figure 4. Spreadability of Gel 1

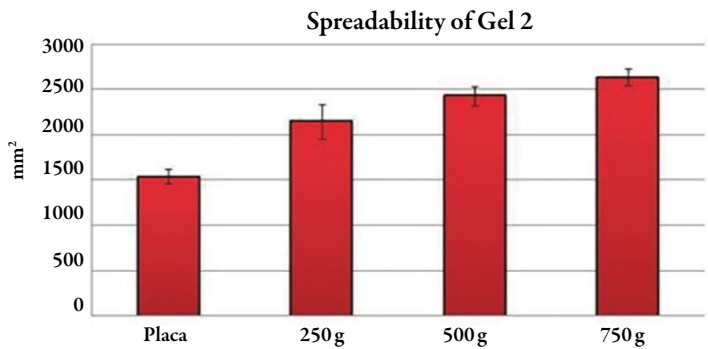


Figure 5. Spreadability of Gel 2

The spreadability test of the topical gel allows for the evaluation of product changes and can indicate ease or difficulty in its application [20]. Spreadability is explicitly demonstrated by the amplification of formulations intended for topical applications over a specific period at targeted sites, making it an essential attribute in pharmaceutical forms. In semi-solid formulations for topical use, quantifying this parameter is important to monitor changes in the formulation's ability to spread in a specific area, which can either facilitate or hinder its application, distribution, and/or absorption through the skin [15].

Microbiological Quality Control

Viable Microorganism Count

In the viable microorganism count assay using agar casein soy culture medium for bacteria, the plates showed low colony growth as shown in table 4, not exceeding the limits allowed by the Brazilian Pharmacopoeia, 6th edition; 2019, which sets a maximum limit of 10^2 CFU of non-pathogenic bacteria for non-sterile products. There was also low fungal growth in the samples cultured on Sabouraud medium, complying with the limits specified by the Brazilian Pharmacopoeia, 6th edition; 2019, which sets a maximum limit of 10^1 CFU per plate.

Table 4. Viable Microorganism Count

Bacteria (Soy Casein Agar)		
Sample	Bacteria (Soy Casein Agar)	Fungi (Sabouraud Dextrose Agar)
Gel 1	3.3 UFC/mL	6.6 UFC/mL
Gel 2	20 UFC/mL	10 UFC/mL

Microbiological evaluation allows verifying whether the choice of the preservation system is adequate or if interactions between formulation components may compromise its efficacy [17].

Microbial contamination of a product can cause changes in its physical and chemical properties and also pose a risk of infection to the user. Therefore, orally and topically used pharmaceutical products (capsules, tablets, suspensions, creams, patches, etc.) that are not intended to be sterile should be subject to microbial contamination control. Quality assurance and manufacturing control provided by good practices should ensure that the product meets the specified requirements, including acceptable limits for microorganisms, among other parameters [16].

Other criteria that should also be considered include the microbial load of raw materials, the manufacturing process, the product formulation, and the results of water activity determination, when applicable. Low water activity results (equal to or less than 0.75 measured at 25 °C), as well as low or high pH, absence of nutrients, and the addition of preservatives, help prevent microbial contamination [16].

CONCLUSION

The gel base formulations of Carbopol® 940 gel and *A. occidentale* glycolic extract demonstrated acceptable physicochemical characteristics after manipulation. This work

contributed to clarifying important aspects in the field of compounding, as the pharmaceutical development and characterization study allows for a better understanding of the physicochemical nature of the vehicle and quality control of raw materials and finished products. Based on the results of this study, it can be stated that Gel 2 exhibited relevant and positive characteristics when compared to Gel 1, resulting in a homogeneous appearance and pleasant odor, as well as superior spreadability. Therefore, it can be suggested that the presented gel formulation is stable, with the composition of the gel considered appropriate, thus ruling out the need for reformulation.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have reported no conflicts of interest.

REFERENCES

1. R. Rico, M. Bulló, J. Salas-Salvadó, Nutritional composition of raw fresh cashew (*Anacardium occidentale* L.) kernels from different origin, *Food Science & Nutrition*, **4**(2), 329-338 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1002/fsn3.294>
2. R. D'Amico, M. Cordaro, R. Fusco, A.F. Peritore, T. Genovese, E. Gugliandolo, Consumption of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nuts counteracts oxidative stress and tissue inflammation in mild hyperhomocysteinemia in rats, *Nutrients*, **14**(7), 1474 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/nu14071474>
3. O.A. Olajide, M.A. Aderogba, B.L. Fiebich, Mechanisms of anti-inflammatory property of *Anacardium occidentale* stem bark: Inhibition of NF- κ B and MAPK signalling in the microglia, *Journal of Ethnopharmacology*, **145**(1), 42-49 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.031>
4. G.V. Schirato, F.M.F. Monteiro, F.D.O. Silva, J.L.D. Lima Filho, A.M.D.A.C. Leão, A.L.F. Porto, O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas, *Ciencia Rural*, **36**(1), 149-154 (2006). URL: <https://www.scielo.br/j/cr/a/Y9ZsHmcRGdN7m5zJ74NvqCv/?format=pdf&lang=pt>
5. E.W.C. Chan, S. Baba, H.T. Chan, M. Kainuma, T. Inoue, S.K. Wong, Ulam herbs: A review on the medicinal properties of *Anacardium occidentale* and *Barringtonia racemose*, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **7**(2), 241-247 (2017). Doi: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70235>

6. B.I. Aderiye, O.M. David, *In vitro* antibacterial activity of aqueous extracts of cashew (*Anacardium occidentale* L.) fruit peels using bioautography method, *European Journal of Medicinal Plants*, **4**(3), 284-291 (2014). Doi: <https://doi.org/10.9734/EJMP/2014/6722>
7. O.S.Nwozo, E.M. Effiong, P.M. Aja, C.G. Awuchi, Antioxidant, phytochemical, and therapeutic properties of medicinal plants: A review, *International Journal of Food Properties*, **26**(1), 359-388 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2157425>
8. K. Periyamayagam, T. Sasikala, V. Karthikeyan, S. Jegadeesh, R.J. Gracelet, Pharmacognostical and phytochemical studies on the leaves of *Anacardium occidentale* Linn, *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2**(1), 41-48 (2014). URL: <https://www.wjpsonline.com/index.php/wjps/article/view/pharmacognostical-phytochemical-studies-anacardium-occidentale>
9. M.S.D.A. Vilar, G.L. Souza, D.D.A. Vilar, J.A. Leite, F.N. Raffin, J.M. Barbosa-Filho, T.F.A.L. Moura, Assessment of phenolic compounds and anti-inflammatory activity of ethyl acetate phase of *Anacardium occidentale* L. bark, *Molecules*, **21**(8), 1087 (2016). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules21081087>
10. M.G. Fontoura, L. Santos Rodrigues, A.S. Reis, A.A. Berretta, M.C.G. Maciel, Therapeutic potential of *Punica granatum* in wound healing: An overview, *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, **51**(2), 992-1008 (2022). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n2.99252>
11. C.D. Weller, Team, A. Sussman, First-line interactive wound dressing update: A comprehensive review of the evidence, *Frontiers in Pharmacology*, **11**, 155 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00155>
12. J.A. Padilha, L.N. Vieira, V.F. Magalhães, R.E.D. Reginato, C.M.B.L. Lima, M.D.F.F.M. Diniz, Therapeutic effects of *Anacardium occidentale*: An integrative review, *Acta Brasiliensis*, **4**(3), 178-186 (2020). Doi: <https://doi.org/10.22571/2526-4338368>
13. N.S. Carvalho, M.M. Silva, R.O. Silva, L.A. Nicolau, F.B.M. Sousa, S.R. Damasceno, J.V.R. Medeiros, Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats, *Drug Development Research*, **76**(3), 143-151 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1002/ddr.21250>

14. M.T. Knorst, *Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides*. (Lam). DC. Compositae.* (Marcela), M. Sc. thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991, p. 257.
15. G. Borghetti, M.T. Knorst, Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **42**(4), 531-537 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000400008>
16. ANVISA, *Farmacopéia Brasileira*, 6. ed., v. 1, Brasília, 2019.
17. ANVISA, *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*, Brasília, 2004.
18. M.V. Singh, L.O. Dias, N.L.F. Baldini, D. Silveira, R. Zago, Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da estabilidade de gel com extrato aquoso de camomila para uso bucal, *Revista Brasileira de Farmacia*, **89**(2), 138-142 (2008). URL: https://www.researchgate.net/publication/282672903_Desenvolvimento_farmacotecnico_e_avaliacao_da_estabilidade_de_gel_com_extrato_aquoso_de_camomila_para_uso_bucal
19. D. Bhangare, N. Rajput, T. Jadav, A.K. Sahu, R.K. Tekade, P. Sengupta, Systematic strategies for degradation kinetic study of pharmaceuticals: An issue of utmost importance concerning current stability analysis practices, *Journal of Analytical Science and Technology*, **13**, 7 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s40543-022-00317-6>
20. C. Bugnotto, G. Soares, L.V. Laporta, M.P. Alves, C.A. Schmidt, J.B. Limberger, Estudo de estabilidade de formulação tópica contendo própolis, *Disciplinarum Scientia - Saúde*, **7**(1), 1-12 (2006). URL: <https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumS/article/view/897/841>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

D.I. Medeiros-Dantas, T. Nagashima Junior, Pharmacotechnical development and characterization of gel based on *Anacardium occidentale* L., *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 4-18 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.109133>

Therapeutic role of medicinal plants against viral diseases focusing on COVID-19: Application of computational chemistry towards drug design

Fatemeh Mollaamin ^{1*}, Sara Shahriari ², Majid Monajjemi ³

¹ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering and Architecture, Kastamonu University, Kastamonu, Turkey.

² Department of Chemistry, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³ Department of Chemical Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author E-mail: smollaamin@gmail.com

Received: September 8, 2023

Corrected: December 5, 2023

Accepted: December 13, 2023

SUMMARY

Introduction: The phytochemicals of curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol extracted from *Garlic*, *Turmeric/Curcuma*, *Green tea*, *Welsh onion/Leek*, and *Ginger*, respectively, were studied in this paper. Therefore, the purpose of this research is evaluating the effective physicochemical properties of these herbal products to fight against the SARS-CoV-2 infection. **Materials and Methods:** The properties of these phytochemicals including dipole moment, thermochemistry, chemical shielding tensors, charge density, electrostatic potential and electron donating and electron accepting through frontier orbitals have been computed due to density functional theory (DFT) and m062x/cc-pvdz pseudo=CEP method towards the drug delivery system. **Results and Discussion:** Thermochemical properties have evaluated the combined group contribution and atom connectivity index with uncertainties in the estimated property values. The minimum Gibbs free energy of -1014.602×10^3 and -990.992×10^3 kcal·mol⁻¹ for luteolin-7-glucoside and epicatechin-gallate, respectively, has been calculated versus dipole moment, which can indicate the most stability of these structures as natural antiviral medications. In fact, it can be established how phytochemicals of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol extracted from *Garlic*, *Turmeric/Curcuma*, *Green tea*, *Welsh onion/Leek*, and *Ginger*, respectively, may act as the efficient antiviral of Coronavirus disease receptor. The NMR analysis

has demonstrated the critical points of the principal components of medicinal plants for binding to the active site of TMH (Tyr160-Met-161-Hi162) COVID-19, while each active atom of O or N as the electronegative atoms for binding to the H remarks the maximal shift in all steps in the NMR spectrum. Moreover, UV-VIS spectra reported a positive induction of antioxidant compounds, such as polyphenols and flavonoids. **Conclusions:** Thus, these natural drugs may be either a new or safe treatment or even are employed as antiviral nutraceuticals in elevating immunity and producing endurance to virus infections.

Keywords: COVID-19; TMH protein; medicinal plant; DFT

RESUMEN

Papel terapéutico de las plantas medicinales contra enfermedades virales centradas en COVID-19: aplicación de la química computacional al diseño de fármacos

Introducción: En este artículo se estudiaron los fitocompuestos de curcumina, galato de epicatequina, luteolina-7-glucósido y zingerol extraídos de ajo, cúrcuma/cúrcuma, té verde, cebolla galesa/puerro y jengibre, respectivamente. Por tanto, el propósito de esta investigación es evaluar las propiedades fisicoquímicas efectivas de estos productos herbales para luchar contra la infección por SARS-CoV-2. **Materiales y métodos:** Las propiedades de estos fitocompuestos, incluido el momento dipolar, la termoquímica, los tensores de protección química, la densidad de carga, el potencial electrostático y los orbitales donadores y receptores de electrones a través de la frontera, se han calculado gracias a la teoría funcional de la densidad (DFT) y el pseudo método m062x/cc-pvdz CEP enfocado en el sistema de administración de fármacos. **Resultados y Discusión:** Las propiedades termoquímicas han evaluado la contribución combinada del grupo y el índice de conectividad atómica con incertidumbres en los valores estimados de las propiedades. La energía libre de Gibbs mínima de $-1014,602 \times 10^3$ y $-990,992 \times 10^3$ kcal·mol⁻¹ para luteolina-7-glucósido y galato de epicatequina, respectivamente, se ha calculado frente al momento dipolar, lo que puede indicar la mayor estabilidad de estas estructuras como Medicamentos antivirales naturales. De hecho, se puede establecer cómo los fitocompuestos de alicina, curcumina, galato de epicatequina, luteolina-7-glucósido y zingerol extraídos de ajo, cúrcuma/cúrcuma, té verde, cebolla galesa/puerro y jengibre, respectivamente, pueden actuar como el eficaz antiviral del receptor de la enfermedad del coronavirus. El análisis de RMN ha demostrado los puntos

críticos de los componentes principales de las plantas medicinales para unirse al sitio activo de TMH (Tyr160-Met-161-Hi162) COVID-19, mientras que cada átomo activo de O o N como átomos electronegativos para unirse a la H señala el cambio máximo en todos los pasos en el espectro de RMN. Además, los espectros UV-VIS informaron una inducción positiva de compuestos antioxidantes, como polifenoles y flavonoides. **Conclusiones:** Por lo tanto, estos medicamentos naturales pueden ser un tratamiento nuevo o seguro o incluso usarse como nutracéuticos antivirales para elevar la inmunidad y producir resistencia a las infecciones virales.

Palabras clave: COVID-19; proteína TMH; planta medicinal; DFT

RESUMO

Papel terapêutico das plantas medicinais contra doenças virais com foco no COVID-19: Aplicação da química computacional no design de medicamentos

Introdução: Os fitocompostos de curcumina, epicatequina-galato, luteolina-7-glicosídeo e zingerol extraídos de alho, cúrcuma/cúrcuma, chá verde, cebola galesa/alho-poró e gengibre, respectivamente, foram estudados neste artigo. Portanto, o objetivo desta pesquisa é avaliar as propriedades físico-químicas eficazes desses produtos fitoterápicos no combate à infecção por SARS-CoV-2. **Materiais e Métodos:** As propriedades desses fitocompostos, incluindo momento de dipolo, termoquímica, tensores de proteção química, densidade de carga, potencial eletrostático e doação e aceitação de elétrons através de orbitais de fronteira foram computadas devido à teoria do funcional de densidade (DFT) e pseudo método m062x/cc-pvdz CEP para o sistema de entrega de medicamentos. **Resultados e Discussão:** As propriedades termoquímicas avaliaram a contribuição combinada do grupo e o índice de conectividade atômica com incertezas nos valores estimados das propriedades. A energia livre de Gibbs mínima de $-1014,602 \times 10^3$ e $-990,992 \times 10^3$ kcal.mol⁻¹ para luteolina-7-glicosídeo e epicatequina-galato, respectivamente, foi calculada versus momento dipolar, o que pode indicar a maior estabilidade dessas estruturas como medicamentos antivirais naturais. Na verdade, pode-se estabelecer como os fitocompostos de alicina, curcumina, epicatequina-galato, luteolina-7-glicosídeo e zingerol extraídos do alho, cúrcuma/cúrcuma, chá verde, cebola galesa/alho-poró e gengibre, respectivamente, podem atuar como o eficiente antiviral do receptor da doença por Coronavírus. A análise de RMN demonstrou os pontos críticos dos principais componentes das plantas medicinais para ligação ao sítio

ativo do TMH (Tyr160-Met-161-Hi162) COVID-19, enquanto cada átomo ativo de O ou N como átomos eletronegativos para ligação ao H observa o deslocamento máximo em todas as etapas do espectro de RMN. Além disso, os espectros UV-VIS relataram uma indução positiva de compostos antioxidantes, como polifenóis e flavonóides. **Conclusões:** Assim, esses medicamentos naturais podem ser um tratamento novo ou seguro ou até mesmo serem empregados como nutracêuticos antivirais para aumentar a imunidade e produzir resistência a infecções virais.

Palavras-chave: COVID-19; proteína TMH; planta medicinal; DFT

INTRODUCTION

Notwithstanding vaccine progress, Coronavirus disease therapy still stays dramatically supportive with a prompt demand to recognize impressive anti-coronavirals. A noteworthy method is reusing medications already released for other maladies. In this regard, several investigations have been carried out to inquire whether antimalarial medications could cure Coronavirus disease. Recently, antiviruses have been almost all produced in human cells, transformed animal cells, and these are platforms that require a lot of equipment, which are very long to set up. The arrival of a recent coronavirus, known as the SARS-CoV-2 has initiated a pandemic of Coronavirus disease [1-4].

Natural medications are an important part of common health notwithstanding the progress of the health system. Local treatment in rural zones keeps its importance as the primary procedure in the usual seasonal maladies like colds and flu [5-8]. The most important reason for herbs and medicinal plant treatment is the belief that it will influence healthier. The natural products interrupt the viral life of SARS-CoV-2 [9-14]. Many plant-based antibodies can respond very quickly to the emergence of new variants of Coronavirus disease [15-19].

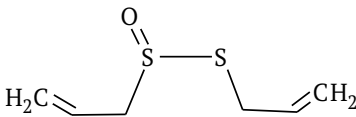
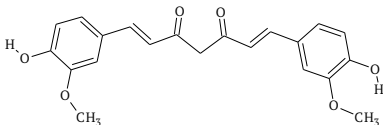
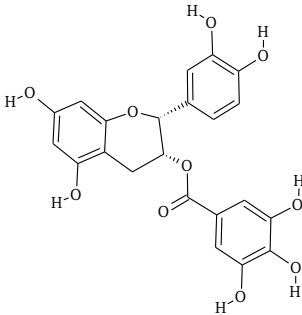
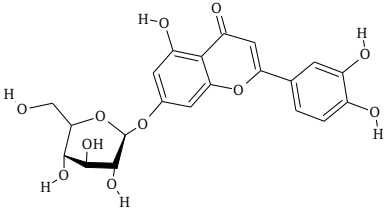
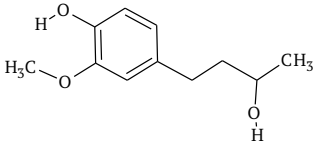
People are reminded to take measures to decrease their risk of COVID-19 consisting of public health and social measures such as wearing masks, hand hygiene, physical distancing, increasing ventilation of inside spaces, preventing crowded spaces, and getting vaccinated [20-22]. It has been announced that the global outbreak of special life-threatening pneumonia resulted about 800 deaths which were world identified as the harsh syndrome CoV (SARS-CoV) [23-27]. In addition, improved researches have exhibited that the source of SARS-CoV based on the phylogenetic discussion is most likely from bats which are converted to human aerosols because of intermediate hosts such as infectious palm civets by the virus [28-30]. CoV closely relates to strong breathing syndrome CoV (SARS-CoV), which is an epidemic with a short period of living

time. Moreover, MERS-CoV indicates SARS-like symptoms through human infections, consisting of the signs like influenza: high fevers, fatigue, malaise, and rigors, but it has been observed later improvement into typical pneumonia in most samples. Therefore, the animal patience of CoV, through its power of intermediate transition into human, is threatening that has been concluded with a new case of MERS-CoV recommending bats and dromedary camels as the source for this kind of virus sample [31-37].

In some works, it has been explored that a prototype of the Coronaviridae family is an infectious bronchitis virus (IBV) which corresponds to the genetic group III of CoV and produces strong economic problem for the poultry sources in the world society [38-41]. In fact, the researchers have not achieved any vaccine or specific antiviral cures by managing the treatment of symptoms, and collecting the experimental information [42-44]. Environmental elements can greatly affect the secretion of secondary metabolites from tropical plants. Therefore, great attention has been paid to the secondary metabolites conducted by plants in tropical regions that may be developed as medicines [45-47]. Several compounds, such as flavonoids, from medicinal plants, have been reported to have antiviral bioactivities [48-50]. In the present study, it has been investigated the phytochemicals of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7- glucoside, and zingerol extracts from *Garlic*, *Turmeric/Curcuma*, *Green tea*, *Welsh onion/Leek*, and *Ginger*, respectively as the probable anti-COVID-19 receptor derived from medicinal plants (Table 1).

The achieving of the present study will provide other researchers with opportunities to identify the right drug to combat COVID-19 by theoretical methodologies to guess the effect of hydrogen bonding in various attachments through seven medicinal plants of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol extracts from *Garlic*, *Turmeric/Curcuma*, *Green tea*, *Welsh onion/Leek*, and *Ginger*, respectively, bonded to the active site of COVID-19 PDB.

Table 1. Allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7- glucoside, and zingerol as the probable anti- COVID-19 receptor derived from medicinal plants.

Compound	Molecular structure	Sources
Allicin		<i>Garlic</i> 
Curcumin		<i>Turmeric/ Curcuma</i> 
Epicatechin-gallate		<i>Green tea</i> 
Luteolin-7- glucoside		<i>Welsh onion/ Leek</i> 
Zingerol		<i>Ginger</i> 

MATERIAL AND METHODS

In this article, the properties of thermodynamic parameters of infrared spectroscopy, chemical shielding of nuclear magnetic resonance analysis, charge density, electrostatic potential and electron donating and electron accepting towards a drug design model by GaussView 6.1 [51] and Gaussian 16 revision C.01 program have been done [52]. In addition, the atomic orbitals were affiliated to unravel the gauge subject in the computation of nuclear magnetic resonance for phytochemicals of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol extracts from *Garlic*, *Turmeric*/*Curcuma*, *Green tea*, *Welsh onion*/*Leek*, and *Ginger*, respectively (Table1) [53-55].

First, the attachment of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol bonded to the active site of COVID-19 protein has been accomplished by forming relatively stable complexes through the hydrogen bonding. Then, one series of quantum force fields including m062x/cc-pvdz pseudo=CEP for complexes of seven inhibitors for COVID-19 has been accomplished through discovering the minimized coordination of the best molecules of natural plant-TMH drug design sample with IR calculations using the Gaussian 16 revision C.01 program [52]. It has been remarked that polarization functions into the employed basis set in the theory always presents us an magnificent achievement on simulation and modeling of theoretical studies [56-60].

Then, normal mode results are the discovery of potential harmonic wells by analytic methodologies that save the movement of all atoms simultaneously in the vibration time range toward a natural discussion of structural vibrations [61-64].

RESULTS AND DISCUSSION

Geometry optimization

So, the minimized geometry coordination of medicinal ingredients-TMH complexes toward the drug design has been run through the active site of certain O, N, and H atoms in the linkage of bond and torsion angles (Table 2).

For finding a constant molecule of medicinal plant linkage of COVID-19 active site, geometry optimization plus the nuclear magnetic resonance estimation, intensity and harmonic frequency of different normal modes were computed with ab initio methods, and the IR spectral were analyzed. The theoretical computations were run at different levels of calculations to achieve the more accurate equilibrium geometrical consequences and infrared spectral information for each of the certain molecules. It is recommended that polarization functions and an additional diffuse into employed

basis sets in the calculation lead us to the significant improvement on the consequences of theoretical levels. The simulation exhibits the methodologies that produce a common model template at a particular temperature by measuring all physicochemical characteristics through the partition functions. Each part of the model consisting of natural components-TMH, has been minimized by quantum mechanics calculation of DFT level including ECP computations with pseudo=CEP basis sets. Moreover, these systems have been estimated by QM/MM method duty to the ONIOM method.

Table 2. The optimized characteristics of allicin, curcumin, Luteolin-7-glucoside, and zingerol bonded to TMH active site through the drug design method.

Medicinal structures – COVID-19 target	Bond length	(Å)	Bond/Torsion angle	(°)
Allicin	C37-O38	1.3600	C37-O38-H39	113.00
	O38-H39	0.9600		
	H39-S4	1.5042	C37-O38- H39- S4	41.81
Curcumin	N95-H96	1.0099	N95-H96-O9	117.25
	H96-O9	0.9706		
	O9-C6	1.3621	N95-H96-O9-C6	78.71
Luteolin-7-glucoside	N100-H101	1.0098	N100- H101-O32	155.14
	H101-O32	0.9362		
	O32-C13	1.3606	N100-H101-O32-C13	-88.90
Zingerol	N78-H79	1.0100	N78-H79-O11	130.22
	H79-O11	0.9966		
	O11-C9	1.4087	N78-H79-O11-C9	148.05

Thermodynamic properties analysis & infrared spectroscopy

Thermodynamic parameters for allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol extracts from *Garlic*, *Turmeric/Curcuma*, *Green tea*, *Welsh onion/Leek*, and *Ginger*, respectively have been reported in Table 3 and Figure1.

Table 3. Thermodynamic parameters for allicin, curcumin, epicatechin-gallate, and luteolin-7- glucoside, and zingerol using density functional theory method and “m062x/cc-pvdz pseudo=CEP” level.

Phytochemicals	$\Delta E^\circ \times 10^{-3}$ (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta H^\circ \times 10^{-3}$ (kcal.mol ⁻¹)	$\Delta G^\circ \times 10^{-3}$ (kcal.mol ⁻¹)	ΔS° (cal.K ⁻¹ .mol ⁻¹)	Dipole moment (Debye)
Allicin	-685.830	-685.829	-685.858	96.825	3.0022
Curcumin	-781.953	-781.953	-781.990	124.909	4.3688
Epicatechin-gallate	-990.953	-990.953	-990.992	133.472	3.7835
Luteolin-7-glucoside	-1014.564	-1014.564	-1014.602	127.737	3.4279
Zingerol	-405.017	-405.017	-405.046	98.991	2.1572

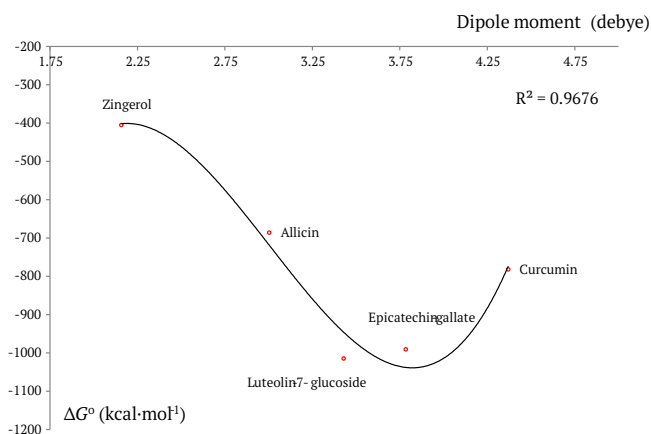
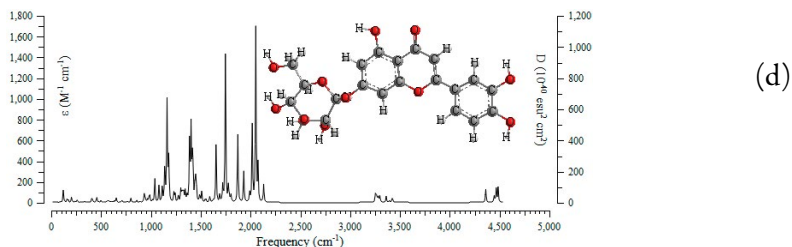
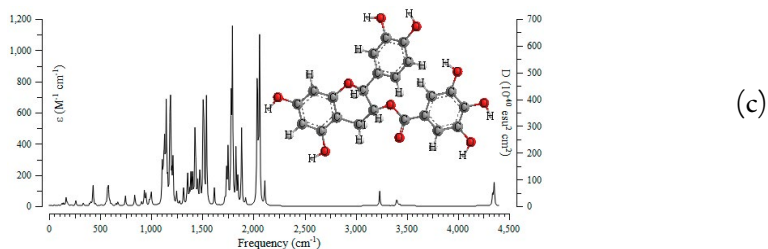
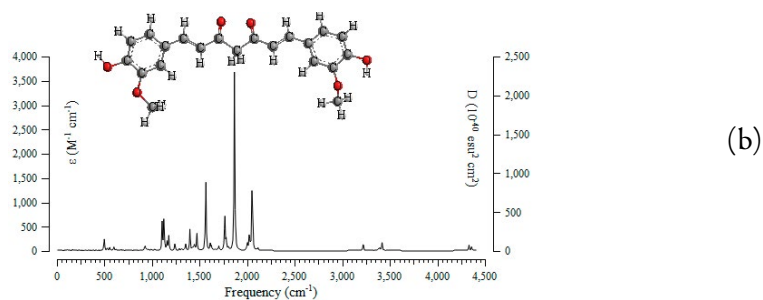
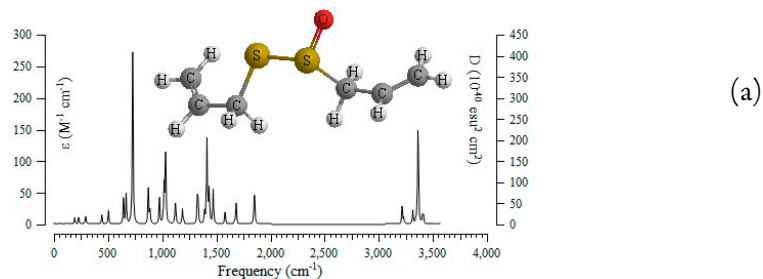
**Figure 1.** The ΔG° /kcal.mol⁻¹ versus dipole moment/ debye for allicin, curcumin, epicatechin-gallate, and luteolin-7-glucoside, and zingerol.

Figure 1 has shown the minimum Gibbs free energy consisting of -1014.602×10^3 and -990.992×10^3 kcal.mol⁻¹ for luteolin-7-glucoside and epicatechin-gallate, respectively, versus dipole moment which can indicate the most stability of these structures of the antiviral natural medications.

A comparison was made between thermodynamic properties of live matter of the analyzed plants. Moreover, the effectiveness of the process was analyzed through standard enthalpy, entropy, and Gibbs energy of biosynthesis. The pure component properties are estimated for active pharmaceutical ingredients that are related or proposed for the treatment of severe acute respiratory syndrome-CoronaVirus-2. Thermodynamic

properties can estimate the combined group contribution and atom connectivity index with uncertainties in the estimated property values.

Moreover, the spectroscopy of infrared for major sesquiterpenes of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, and luteolin-7-glucoside, and zingerol has been achieved due to density functional theory method and “m062x/cc-pvdz pseudo=CEP” keyword (Figure 2 a-e).



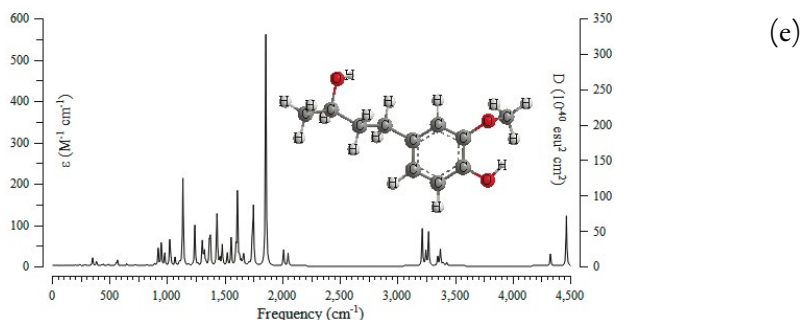


Figure 2. Infrared spectrums of of a) allicin, b) curcumin, c) epicatechin-gallate, d) luteolin-7-glucoside, and e) zingerol to TMH (Tyr160-Met-161-Hi162) through the drug design method calculated by m062x/cc-pvdz pseudo=CEP.

The most fluctuation of frequency of infrared spectra for allicin, curcumin, epicatechin-gallate, and luteolin-7-glucoside, and zingerol has been approximately seen between 500–2000 cm^{-1} (Figure 2 a-e).

Quality control of plant-based medicine and supplements must be carried out to ensure uniformity in quality and safety in their use, resulting in the need for effective and accurate analytical methods. In this article, IR spectroscopy has analyzed the qualitative and quantitative parameters that is accurate and nondestructive. This approach has been applied for quantitative analysis of compounds in complex matrices such as plant-based medicine and supplements supported by chemometrics techniques.

Chemical shielding insight through nuclear magnetic resonance spectrum

The heterocyclic antiviral phytochemicals of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol have approximately shown the equal manner from 20 to 200 ppm for different atoms of these phytochemicals (Figure 3 a-e). The nuclear magnetic resonance spectrum displayed the steepest peak in 40 ppm and the fragile peaks of nuclear magnetic resonance have approximately in 100–200 ppm for all three antiviral phytochemicals including allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol, respectively (Figure 3 a-e).

The computation of hydrogen nuclear magnetic resonance on the foundation of amino acids in the beta-sheet conformation Tyrosine-Methionine-Histidine and the five main ingredients of medicinal plants including allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol have been evaluated to explorer the certain atoms

of hydrogen, nitrogen and oxygen in the critical areas of these anti-virus medicines through the generating of H-bonding by identifying the attack point of Tyrosine-Methionine-Histidine (Figure 3 a-e).

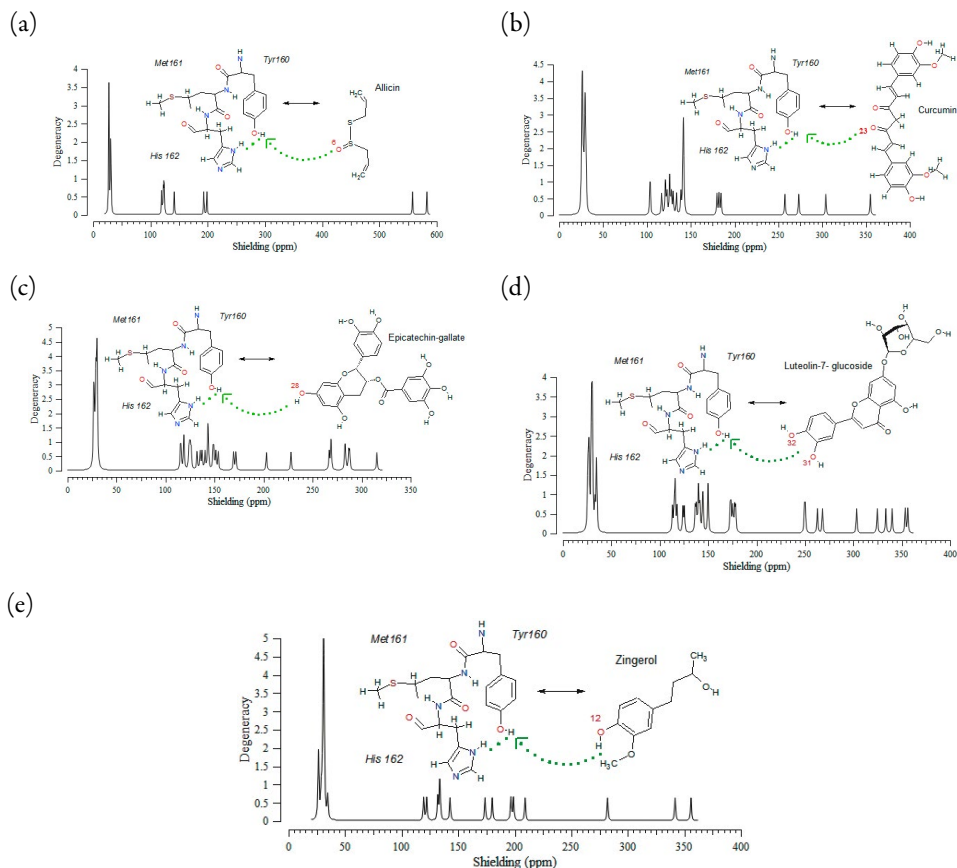


Figure 3. NMR spectra of a) allicin, b) curcumin, c) epicatechin-gallate, d) luteolin-7- glucoside, and e) zingerol bonded to TMH (Tyr160-Met161-His162) COVID-19 active site through the drug design method by showing the active region of TMH in the drug design process.

The nuclear magnetic resonance analysis shows the critical points of the principal components of medicinal plants for binding to the Tyr160-Met161-His162 (TMH) due to producing the anti-virus drugs, while each active atom of O and N as the electro-negative atoms for the H remarks the maximal shift in all steps in the NMR spectrum (Figure 3 a-e).

However, NMR method is insensitive and requires a relatively large amount of sample to make a measurement. Furthermore, in herbal medicines analysis, one of the obstacles is the efficiency of the analysis, because the complex components of medicinal plants can complicate the process. In addition, the analysis process can also damage the material.

Frontier orbitals

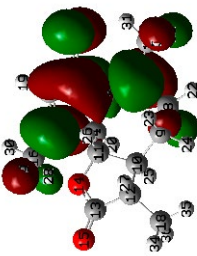
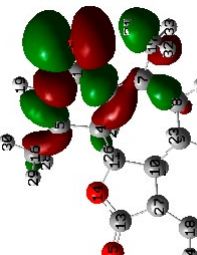
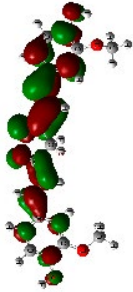
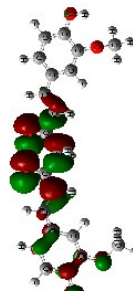
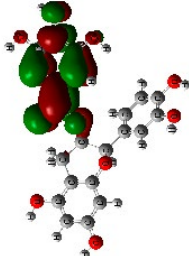
The Frontier orbitals (FMOs) have been estimated for some effective phytochemicals of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol extracts from *Garlic*, *Turmeric/Curcuma*, *Green tea*, *Welsh onion/Leek*, and *Ginger*, respectively (Table 4).

The highest occupied molecular orbital energy (HOMO/eV), the lowest unoccupied molecular orbital energy (LUMO/eV) and band energy gap " ΔE " (eV) indicated the pictorial description of positive and negative areas that are a crucial agent for recognizing the molecular specifications of antiviral phytochemicals consisting of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol (Table 4).

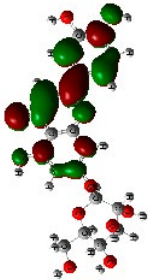
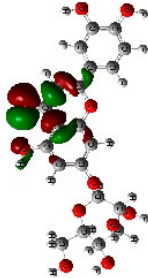
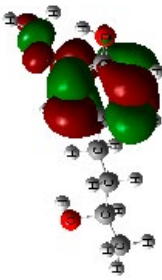
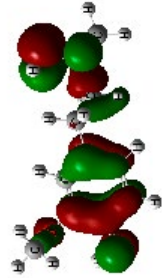
FMOs pinpoint the locality of chemical bonds that are chemically reactive because of the associated orbital energies and thus have achieved great success in describing chemical reactivity, mainly for small systems. Orbitales are localized in both physical and energy spaces and thus contain both orbital locality and energy information.

The applications of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol in its equilibrium geometry, inter- and intra-molecular charge-transfer systems, and two transition states of a bifurcating reaction demonstrate that FMOs can connect quantum mechanical treatments of chemical systems and chemical reactivities by locating the reactive region of large chemical systems. The role of FMOs can be described for small systems and describe the chemical reactivity of large systems with energy and locality insight, with potentially broad applications.

32 **Table 4.** The Frontier orbitals' parameters of antiviral phytochemicals including allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7- glucoside, and zingerol.

Molecule	E _{LUMO} (eV)		E _{HOMO} (eV)		$\Delta E = E_{LUMO} - E_{HOMO}$ (eV)
Allicin					7.4899
Curcumin					4.3043
Epicatechin-gallate					5.4754

(Continued)

Molecule	E_{LUMO} (eV)		E_{HOMO} (eV)		$\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$ (eV)
Luteolin-7-glucoside					4.1132
Zingerol					6.9611
	$\mu = (E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}})/2$	$\chi = -(E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}})/2$	$\eta = (E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}})/2$		$\psi = \mu^2/(2\eta)$
Allicin	-4.46955	4.46955	3.74495		2.6671
Curcumin	-1.18205	1.18205	2.15215		0.3246
Epicatechin-gallate	-0.4942	0.4942	2.7377		0.0446
Luteolin-7-glucoside	-0.6599	0.6599	2.0566		0.1058
Zingerol	-0.22995	0.22995	3.48055		0.0076

Analysis of Ultraviolet-Visible spectroscopy

Generally, organic materials are clear to the large energy radiation which forms the ultra-violet (200–400 nm) and visible (400–700 nm) section of the electromagnetic spectrum.

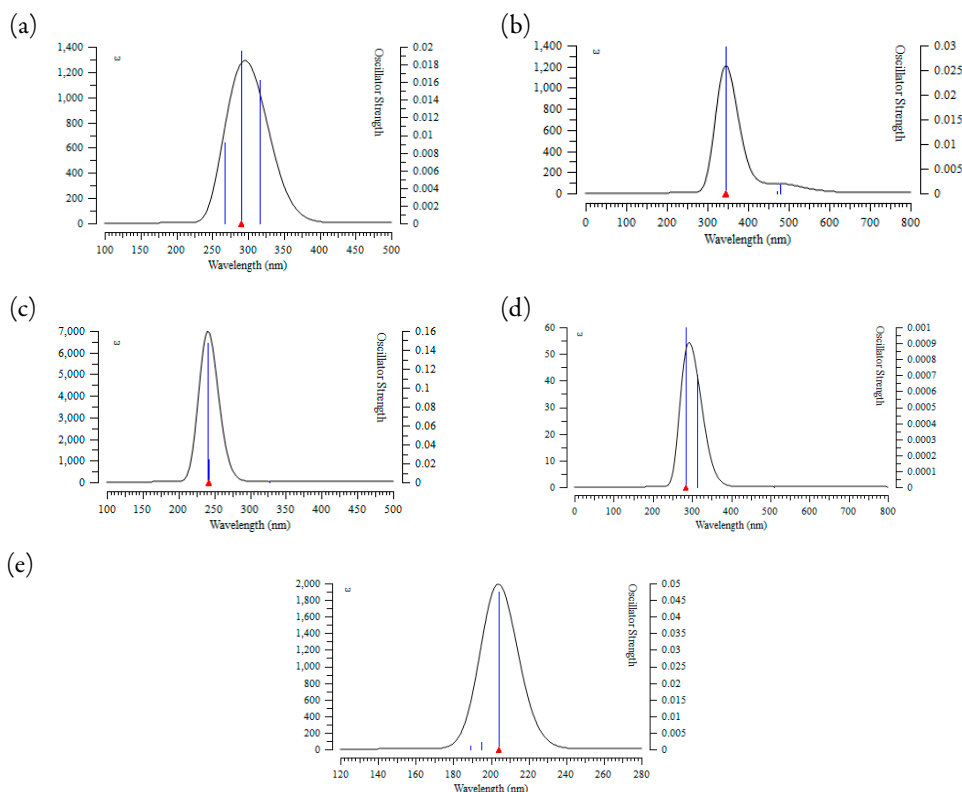


Figure 4. Ultraviolet-Visible spectrums of a) allicin, b) curcumin, c) epicatechin-gallate, d) luteolin-7- glucoside, and e) zingerol.

In the measured amounts of Ultraviolet-Visible spectrums for principal phytochemicals of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol, there are maximum absorption bands between 250–350 nm for allicin with a sharpest peak in 290 nm (Figure 4a), around 300–400 nm for curcumin with a keen peak in 350 nm (Figure 4b), about 200–250 nm for epicatechin-gallate with a pointed peak in 245 nm (Figure 4c), around 250–350 nm for luteolin-7- glucoside with a strong peak in 290 nm (Figure 4d), and near 180–230 nm for zingerol with a steepest peak in 204 nm (Figure 4e).

The medicinal value of plants depends upon phenolics, antioxidants and volatile yield. Enhanced levels of UV radiation can indeed negatively change plant physiological processes, growth and productivity. However, while studying UV effects on medicinal plants, some interesting phenomena have been discovered. Furthermore, UV radiation seems to be a safe alternative as targeted treatment in medicinal and aromatic plants attributed to concurrent increase in different health-related constituents.

CONCLUSIONS

Natural drugs and phytochemical by progressing COVID-19 pandemic have been studied against this viral disease through their biological activities of anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant. The results in this article have remarked that natural drugs due to potential active phytochemicals might grow a further effective species in the remedy of the new coronavirus of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 accountable for Coronavirus malady. Some physical and physicochemical attributes from optimized structure of allicin, curcumin, epicatechin-gallate, luteolin-7-glucoside, and zingerol extracts from *Garlic*, *Turmeric/Curcuma*, *Green tea*, *Welsh onion/Leek*, and *Ginger*, respectively, disclosed to be potent in displaying antiviral activities by interrupting the viral life. Thus, these natural drugs may be either a new or safe treatment or even is employed as antiviral nutraceuticals in elevating immunity and producing endurance to virus infections.

ACKNOWLEDGMENTS

In successfully completing this paper and its research, the authors are grateful to Kastamonu University.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. M. Monajjemi, F. Mollaamin, S. Shojaei, An overview on coronaviruses family from past to COVID-19: Introduce some inhibitors as antiviruses from Gillan's plants, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, **10**(3), 5575-5585 (2020). Doi: <https://doi.org/10.33263/BRIAC103.575585>

2. D.K. Chu, E.A. Akl, S. Duda, K. Solo, S. Yaacoub, H.J. Schünemann, *et al.*, Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: A systematic review and meta-analysis, *The Lancet*, **395**(10242), 1973-1987 (2020). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31142-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31142-9)
3. S. Shahriari, M. Monajjemi, F. Mollaamin, Determination of proteins specification with SARS- COVID-19 based ligand designing, *Journal of the Chilean Chemical Society*, **67**(2), 5468-5476 (2022). Doi: <https://doi.org/10.4067/S0717-97072022000205468>
4. Mollaamin, F. Ilkhani, A. Sakhaei, N. Bonsakhteh, B. Faridchehr, A. Tohidi, S. *et al.*, Thermodynamic and solvent effect on dynamic structures of nano bilayer-cell membrane: Hydrogen bonding study, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, **12**, 3148-3154 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1166/JCTN.2015.4092>
5. S. Shahriari, M. Monajjemi, K. Zare, Penetrating to cell membrane bacteria by the efficiency of various antibiotics (clindamycin, metronidazole, azithromycin, sulfamethoxazole, baxdela, ticarcillin, and clavulanic acid) using S-NICS theory, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, **8**(3), 3219-3223 (2018). URL: https://biointerfaceresearch.com/?page_id=2421
6. M. Monajjemi, M.T. Baie, F. Mollaamin, Interaction between threonine and cadmium cation in $[\text{Cd}(\text{Thr})_n]$ ($n = 1-3$) complexes: Density functional calculations, *Russian Chemical Bulletin*, **59**, 886-889 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11172-010-0181-5>
7. F. Zeng, Y. Huang, Y. Guo, M. Yin, X. Chen, L. Xiao, *et al.*, Association of inflammatory markers with the severity of COVID-19: A meta-analysis, *International Journal of Infectious Diseases*, **96**, 467-474 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.055>
8. F. Mollaamin, S. Shahriari, M. Monajjemi, Treating omicron BA.4 & BA.5 via herbal antioxidant asafoetida: A DFT study of carbon nanocarrier in drug delivery, *Journal of the Chilean Chemical Society*, **68**(1), 5781-5786 (2023). Doi: <https://doi.org/10.4067/S0717-97072023000105781>

9. U.A.P. Flato, P. Biteli, D.O.B.R. Reina, F.T.R. Reina, A.C. Araújo, G.A. de Souza, G. dos Santos Campanari, J.N. Matias, V. Marinho, T.L.Z. Lima, *et al.*, Myocarditis as a serious complication of COVID-19, *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, **8**(3), 26-30 (2021). Doi: <https://doi.org/10.22161/ijaers.83.3>
10. F. Mollaamin, M. Monajjemi, *In silico*-DFT investigation of nanocluster alloys of Al-(Mg, Ge, Sn) coated by nitrogen heterocyclic carbenes as corrosion inhibitors, *Journal of Cluster Science*, **34**, 2901–2918 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10876-023-02436-5>
11. F. Mollaamin, S. Shahriari, M. Monajjemi, Drug design of medicinal plants as a treatment of omicron variant (COVID-19 variant B.1.1.529), *Journal of the Chilean Chemical Society*, **67**(3), 5562-5470 (2022). Doi: <https://doi.org/10.4067/S0717-97072022000305562>
12. S. Singh, M.F. Sk, A. Sonawane, P. Kar, S. Sadhukhan, Plant-derived natural polyphenols as potential antiviral drugs against SARS-CoV-2 via RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibition: An *in-silico* analysis, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **39**(16), 6249-6264 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796810>
13. E.M. Sarasia, S. Afsharnezhad, B. Honarparvar, F. Mollaamin, M. Monajjemi, Theoretical study of solvent effect on NMR shielding tensors of luciferin derivatives, *Physics and Chemistry of Liquids*, **49**, 561-571 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319101003698992>
14. T. Capell, R.M. Twyman, V. Armario-Najera, J.K.C. Ma, S. Schillberg, P. Christou, Potential applications of plant biotechnology against SARS-CoV-2, *Trends in Plant Science*, **25**(7), 635-643 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.009>
15. F. Mollaamin, M. Monajjemi, Thermodynamic research on the inhibitors of coronavirus through drug delivery method, *Journal of the Chilean Chemical Society*, **66**(2), 5195-5205 (2021). Doi: <http://doi.org/10.4067/S0717-97072021000205195>
16. J. Remali, W.M. Aizat, A review on plant bioactive compounds and their modes of action against coronavirus infection, *Frontiers in Pharmacology*, **11**, 589044 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.589044>

17. F. Mollaamin, Physicochemical investigation of anti-COVID19 drugs using several medicinal plants, *Journal of the Chilean Chemical Society*, **67**(2), 5537-5546 (2022). Doi: <https://doi.org/10.4067/S0717-97072022000205537>
18. S. Bibi, M.S. Khan, S.A. El-Kafrawy, T.A. Alandijany, M.M. El-Daly, Q. Yousafi, *et al.*, Virtual screening and molecular dynamics simulation analysis of Forsythoside A as a plant-derived inhibitor of SARS-CoV-2 3CLpro, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **30**(7), 979-1002 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.05.003>
19. M.S. Durstenfeld, M.J. Peluso, N.D. Peyser, F. Lin, S.J. Knight, A. Djibo, R. Khatib, H. Kitzman, E. O'Brien, N. Williams, *et al.*, Factors associated with long COVID symptoms in an online cohort study, *Open Forum Infection Diseases*, **10**(2), 047 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad047>
20. D.B. White, B. Lo, Mitigating inequities and saving lives with ICU triage during the COVID-19 pandemic, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **203**(3), 287-295 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1164/rccm.202010-3809CP>
21. V. La Gatta, V. Moscato, M. Postiglione, G. Sperli, An epidemiological neural network exploiting dynamic graph structured data applied to the COVID-19 outbreak, *IEEE Transactions on Big Data*, **7**(1), 45-55 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1109/TBDDATA.2020.3032755>
22. C. Vicidomini, V. Roviello, G.N. Roviello, *In silico* investigation on the interaction of chiral phytochemicals from *Opuntia ficus-indica* with SARS-CoV-2 M^{pro}, *Symmetry*, **13**(6), 1041 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/sym13061041>
23. K.N. Theken, S.Y. Tang, S. Sengupta, G.A. FitzGerald, The roles of lipids in SARS-CoV-2 viral replication and the host immune response, *Journal of Lipid Research*, **62**, 100129 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100129>
24. C.S. Bhunjun, A.J.L. Phillips, R.S. Jayawardena, I. Promputtha, K.D. Hyde, Importance of molecular data to identify fungal plant pathogens and guidelines for pathogenicity testing based on Koch's postulates, *Pathogens*, **10**(9), 1096 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens10091096>
25. S. Bharadwaj, A. Dubey, U. Yadava, S.K. Mishra, S.G. Kang, V.D. Dwivedi, Exploration of natural compounds with anti-SARS-CoV-2 activity via inhibition of SARS-CoV-2 M^{pro}, *Briefings in Bioinformatics*, **22**(2), 1361-1377 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa382>

26. T. Rehman, M.F. Al Ajmi, A. Hussain, Natural compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (3CLpro): A molecular docking and simulation approach to combat COVID-19, *Current Pharmaceutical Design*, **27**(33), 3577-3589 (2021). Doi: <https://doi.org/10.2174/1381612826999201116195851>
27. C. Vicidomini, V. Roviello, G.N. Roviello, Molecular basis of the therapeutical potential of clove (*Syzygium aromaticum* L.) and clues to its anti-COVID-19 utility, *Molecules*, **26**(7), 1880 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26071880>
28. B. Mitton, R. Rule, M. Said, Laboratory evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia *plus* panel compared to conventional methods for the identification of bacteria in lower respiratory tract specimens: A prospective cross-sectional study from South Africa, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **99**(2), 115236 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115236>
29. S. Waizel-Haiat, J.A. Guerrero-Paz, L. Sanchez-Hurtado, S. Calleja-Alarcon, L. Romero-Gutierrez, A case of fatal rhino-orbital mucormycosis associated with new Onset diabetic ketoacidosis and COVID-19, *Cureus*, **13**(2), e13163 (2021). Doi: <https://doi.org/10.7759/cureus.13163>
30. M. Moraes, T. Mendes, R. Arantes, Smart wearables for cardiac autonomic monitoring in isolated, confined and extreme environments: A perspective from field research in Antarctica, *Sensors*, **21**(4), 1303 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/s21041303>
31. S. Krupanidhi, K.A. Peele, T.C. Venkateswarulu, V.S. Ayyagari, M.N. Bobby, D.J. Babu, A.V. Narayana, G. Aishwarya, Screening of phytochemical compounds of *Tinospora cordifolia* for their inhibitory activity on SARS-CoV-2: An *in silico* study, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **39**(15), 5799-5803 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1787226>
32. X. Hu, Z. Zhou, F. Li, Y. Xiao, Z. Wang, J. Xu, F. Dong, H. Zheng, R. Yu, The study of anti-viral drugs targeting SARS-CoV-2 nucleocapsid and spike proteins through large-scale compound repurposing, *Heliyon*, **7**(3), e06387 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06387>
33. A. Mahmoud, A. Mostafa, A.A. Al-Karmalawy, A. Zidan, H.S. Abulkhair, S.H. Mahmoud, M. Shehata, M.M. Elhefnawi, M.A. Ali, Telaprevir is a potential drug for repurposing against SARS-CoV-2: Computational and *in vitro* studies, *Heliyon*, **7**(9), e07962 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07962>

34. N. Baildya, A.A. Khan, N.N. Ghosh, T. Dutta, A.P. Chattopadhyay, Screening of potential drug from *Azadirachta Indica* (Neem) extracts for SARS-CoV-2: An insight from molecular docking and MD-simulation studies, *Journal of Molecular Structure*, **1227**, 129390 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129390>
35. M.O. Aljahdali, M.H.R. Molla, F. Ahammad, Compounds identified from marine Mangrove plant (*Avicennia alba*) as potential antiviral drug candidates against WDSV, an *in-silico* approach, *Marine Drugs*, **19**(5), 253 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/md19050253>
36. S.M. Revannavar, S.P. Supriya, L. Samaga, V.K. Vineeth, COVID-19 triggering mucormycosis in a susceptible patient: A new phenomenon in the developing world? *BMJ Case Reports*, **14**(4), e241663 (2021). Doi: <http://doi.org/10.1136/bcr-2021-241663>
37. A. Wadaa-Allah, M.S. Emhamed, M.A. Sadeq, N.B.H. Dahman, I. Ullah, N.S. Farrag, A. Negida, Efficacy of the current investigational drugs for the treatment of COVID-19: A scoping review, *Annals of Medicine*, **53**(1), 318-334 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1080/07853890.2021.1875500>
38. H. Luo, M. Yang, Q.L. Tang, X.Y. Hu, M.L. Willcox, J.P. Liu, Characteristics of registered clinical trials on traditional Chinese medicine for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A scoping review, *European Journal of Integrative Medicine*, **41**, 101251 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101251>
39. K.T. Bajgain, S. Badal, B.B. Bajgain, M.J. Santana, Prevalence of comorbidities among individuals with COVID-19: A rapid review of current literature, *American Journal of Infection Control*, **49**(2), 238-246 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.06.213>
40. K. Bakhshi, F. Mollaamin, M. Monajjemi, Exchange and correlation effect of hydrogen chemisorption on Nano V(100) surface: A DFT study by generalized gradient approximation (GGA), *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, **8**(4), 763-768 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1166/jctn.2011.1750>
41. M.F. Haidere, Z.A. Ratan, S. Nowroz, S. Bin Zaman, Y.-J. Jung, H. Hosseinzadeh, J.Y. Cho, COVID-19 vaccine: Critical questions with complicated answers, *Biomolecules and Therapeutics*, **29**(1), 1-10 (2021). Doi: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2020.178>

42. A.J. Kunz-Coyne, A.M. Casapao, C. Isache, J. Morales, Y.S. McCarter, C.A. Jankowski, Influence of antimicrobial stewardship and molecular rapid diagnostic tests on antimicrobial prescribing for extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in bloodstream infection, *Microbiology Spectrum*, **9**(2), e0046421 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00464-21>
43. A.S. Zamri, S. Singh, S.M. Ghazali, L.C. Herng, S.C. Dass, T. Aris, H.M. Ibrahim, B.S. Gill, Effectiveness of the movement control measures during the third wave of COVID-19 in Malaysia, *Epidemiology and Health*, **43**, e2021073 (2021). Doi: <https://doi.org/10.4178/epih.e2021073>
44. P. Xiong, H. Zhang, G. Li, C. Liao, G. Jiang, Adsorption removal of ibuprofen and naproxen from aqueous solution with Cu-doped Mil-101(Fe), *Science of the Total Environment*, **797**, 149179 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149179>
45. D.P. Oran, E.J. Topol, The proportion of SARS-CoV-2 infections that are asymptomatic: A systematic review, *Annals of Internal Medicine*, **174**(5), 655-662 (2021). Doi: <https://doi.org/10.7326/M20-6976>
46. R.Q. Tan, W.T.V. Li, W.Z. Shum, S.C. Chu, H.L. Li, Y.F. Shea, T.W. Chung, A systematic review and meta-analysis protocol examining the clinical characteristics and epidemiological features of olfactory dysfunction (OD) in coronavirus disease 2019 (COVID-19), *Systematic Reviews*, **10**, 73 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01624-6>
47. M.A.A. Zadeh, H. Lari, L. Kharghanian, E. Balali, R. Khadivi, H. Yahyaei, F. Mollaamin, M. Monajjemi, Density functional theory study and anti-cancer properties of shyshaq plant: In view point of nano biotechnology, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, **12**(11), 4358-4367 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1166/jctn.2015.4366>
48. M. Monajjemi, M. Noei, F. Mollaamin, Design of fMet-tRNA and calculation of its bonding properties by quantum mechanics, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **29**(10), 676-683 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1080/15257771003781642>
49. R.J. Eberle, D.S. Olivier, C.C. Pacca, C.M.S. Avilla, M.L. Nogueira, M.S. Amaral, D. Willbold, R.K. Arni, M.A. Coronado, *In vitro* study of hesperetin and hesperidin as inhibitors of zika and chikungunya virus proteases, *PLoS One*, **16**(3), e0246319 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246319>

50. S.I. Mallah, O.K. Ghorab, S. Al-Salmi, O.S. Abdellatif, T. Tharmaratnam, M.A. Iskandar, J.A.N. Sefen, P. Sidhu, B. Atallah, R. El-Lababidi, M. Al-Qahtabi, COVID-19: Breaking down a global health crisis, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **20**, 35 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00438-7>
51. R. Dennington, T.A. Keith, J.M. Millam, GaussView, Version 6.06.16, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2016.
52. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, *et al.*, Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2016.
53. B. Khalili-Hadad, F. Mollaamin, M. Monajjemi, Biophysical chemistry of macrocycles for drug delivery: A theoretical study, *Russian Chemical Bulletin*, **60**, 238-241 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11172-011-0039-5>
54. S. McArdle, A. Mayorov, X. Shan, S. Benjamin, X. Yuan, Digital quantum simulation of molecular vibrations, *Chemical Science*, **10**, 5725-5735 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1039/C9SC01313J>
55. A. Tahan, F. Mollaamin, M. Monajjemi, Thermochemistry and NBO analysis of peptide bond: Investigation of basis sets and binding energy, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, **83**, 587-597 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1134/S003602440904013X>
56. F. Mollaamin, M. Monajjemi, Harmonic linear combination and normal mode analysis of semiconductor nanotubes vibrations, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, **12**, 1030-1039 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1166/jctn.2015.3846>
57. M. Monajjemi, L. Mahdavian, F. Mollaamin, M. Khaleghian, Interaction of Na, Mg, Al, Si with carbon nanotube (CNT): NMR and IR study, *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, **54**, 1465-1473 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1134/S0036023609090216>
58. F. Mollaamin, S. Shahriari.; M. Monajjemi, Monkeypox disease treatment by tecovirimat adsorbed onto single-walled carbon nanotube through drug delivery method, *Journal of the Chilean Chemical Society*, **68**(1), 5796-5801 (2023). Doi: <http://doi.org/10.4067/S0717-97072023000105796>

59. M. Monajjemi, M. Khaleghian, N. Tadayonpour, F. Mollaamin, The effect of different solvents and temperatures on stability of single-walled carbon nanotube: A QM/MD study, *International Journal of Nanoscience*, **09**(05), 517-529 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1142/S0219581X10007071>
60. F. Mollaamin, M. Monajjemi, Molecular modelling framework of metal-organic clusters for conserving surfaces: Langmuir sorption through the TD-DFT/ONIOM approach, *Molecular Simulation*, **49**(4), 365-376 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1080/08927022.2022.2159996>
61. F. Mollaamin, M. Monajjemi, S. Salemi, M.T. Baei, A dielectric effect on normal mode analysis and symmetry of BNNT nanotube, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, **19**(3), 182-196 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1080/15363831003782932>
62. M. Khaleghian, M. Zahmatkesh, F. Mollaamin, M. Monajjemi, Investigation of solvent effects on armchair single-walled carbon nanotubes: A QM/MD study, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, **19**(4), 251-261 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1080/15363831003721757>
63. F. Mollaamin, M. Monajjemi, Adsorption ability of Ga5N10 nanomaterial for removing metal ions contamination from drinking water by DFT, *International Journal of Quantum Chemistry*, **124**, e27348 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1002/qua.27348>
64. F. Mollaamin, M. Monajjemi, Trapping of toxic heavy metals from water by GN-nanocage: Application of nanomaterials for contaminant removal technique, *Journal of Molecular Structure*, **1300**, 137214 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.137214>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

F. Mollaamin, S. Shahriari, M. Monajjemi, Therapeutic role of medicinal plants against viral diseases focusing on COVID-19: Application of computational chemistry towards drug design, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 19-43 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.112978>

El uso de anticuerpos monoclonales en dermatología

Laura Estela Castrillón Rivera*, Alejandro Palma Ramos, Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco, México D. F., México.

*Autora correspondiente: lcrivera@correo.xoc.uam.mx

Recibido: 25 de agosto de 2023

Revisado: 10 de diciembre de 2023

Aceptado: 20 de diciembre de 2023

RESUMEN

Introducción: La participación de los componentes inmunitarios en las patologías inflamatorias de la piel ha traído como consecuencia la posibilidad de intervenir en los procesos que las desencadenan o perpetúan, de ahí la importancia de conocer las diversas terapias biológicas que tienen como blanco, proteínas específicas que son el resultado de la disfunción de la respuesta inmune en varias enfermedades de la piel. En el presente trabajo de revisión, se presentan diversos aspectos relacionados con el criterio de selección de los productos biológicos (o biofarmacéuticos) con particular interés en los anticuerpos monoclonales (mAb) así como las principales patologías dermatológicas en los que se han aplicado. Esto, en virtud de que los mAb se han utilizado mayormente en la terapéutica de neoplasias y se explora la posibilidad de su uso en otros padecimientos de la piel además del cáncer.

Desarrollo del tema: La presente revisión bibliográfica aborda los principales aspectos relacionados con: a) Seguridad e inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales, b) Aplicaciones terapéuticas de los mAb en dermatología: Psoriasis, Dermatitis atópica, Hidrandenigitis supurativa, Urticaria, Pénfigo, Alopecia areata, Pioderma gangrenoso, Pitiriasis nuda, Sarcoidosis cutánea, Síndrome de Behcet y en otras patologías, c) Biosimilares en dermatología y d) Lesiones cutáneas asociadas con el uso de anticuerpos monoclonales. **Discusión:** La terapéutica basada en mAb es un área de constante crecimiento y la tecnología recombinante ha permitido la obtención de moléculas cada vez más estables y menos inmunogénicas que permitirán ofrecer opciones terapéuticas a varias patologías dermatológicas con

características de hiperinflamación o inmunosupresión. **Conclusión:** El aumento de estudios clínicos para el uso potencial de anticuerpos monoclonales en dermatología permitirán su autorización por las agencias regulatorias y aumentar el arsenal terapéutico para padecimientos de difícil control.

Palabras clave: Anticuerpos monoclonales, terapias biológicas, biofármacos

SUMMARY

The use of monoclonal antibodies in dermatology

Introduction: The participation of immune components in inflammatory skin pathologies has brought about the possibility of intervening in the processes that trigger or perpetuate them, hence the importance of knowing the various biological therapies that target specific proteins that They are the result of dysfunction of the immune response in several skin diseases. In the present review work, various aspects related to the selection criteria of biological products (or biopharmaceuticals) are presented with particular interest in monoclonal antibodies (mAb) as well as the main dermatological pathologies in which they have been applied. This is due to the fact that the use of mAbs has been used mainly in the therapy of neoplasias and the possibility of their use in other skin conditions in addition to cancer is being explored. **Development of the topic:** This bibliographic review addresses the main aspects related to: a) Safety and immunogenicity of monoclonal antibodies, b) Therapeutic applications of mAbs in dermatology: Psoriasis, Atopic dermatitis, Hidrandenigtis suppurativa, Urticaria, Pemphigus, Alopecia areata, Pyoderma gangrenosum Pityriasis nubra pilaris, Cutaneous sarcoidosis, Behcet's syndrome and other pathologies, c) Biosimilars in dermatology and d) Skin lesions associated with the use of monoclonal antibodies. **Discussion:** mAb-based therapeutics is an area of constant growth and recombinant technology has allowed the obtaining of increasingly stable and less immunogenic molecules that will allow us to offer therapeutic options for various dermatological pathologies with characteristics of hyperinflammation or immunosuppression. **Conclusion:** The increase in clinical studies for the potential use of monoclonal antibodies in dermatology will allow their authorization by regulatory agencies and increase the therapeutic arsenal for conditions that are difficult to control.

Keywords: Monoclonal antibodies, biological therapies, biopharmaceuticals

RESUMO

O uso de anticorpos monoclonais em dermatologia

Introdução: A participação dos componentes imunes nas patologias inflamatórias da pele tem trazido a possibilidade de intervir nos processos que as desencadeiam ou perpetuam, daí a importância de conhecer as diversas terapias biológicas que têm como alvo proteínas específicas que são o resultado da disfunção do sistema imunológico, resposta em diversas doenças de pele. No presente trabalho de revisão são apresentados vários aspectos relacionados com os critérios de seleção de produtos biológicos (ou biofarmacêuticos) com particular interesse nos anticorpos monoclonais (mAb) bem como nas principais patologias dermatológicas em que têm sido aplicados. Isso ocorre porque os mAbs têm sido utilizados principalmente no tratamento de neoplasias e está sendo explorada a possibilidade de seu uso em outras doenças de pele além do câncer. **Desenvolvimento do tema:** Esta revisão bibliográfica aborda os principais aspectos relacionados a: a) Segurança e imunogenicidade de anticorpos monoclonais, b) Aplicações terapêuticas de mAbs em dermatologia: Psoríase, Dermatite atópica, Hidrandenigitis supurativa, Urticária, Pênfigo, Alopecia areata, Pioderma gangrenoso, Pitiríase nuda, Sarcoidose cutânea, síndrome de Behçet e outras patologias, c) Biossimilares em dermatologia e d) Lesões cutâneas associadas ao uso de anticorpos monoclonais. **Discussão:** A terapêutica baseada em mAb é uma área em constante crescimento e a tecnologia recombinante tem permitido a obtenção de moléculas cada vez mais estáveis e menos imunogênicas que nos permitirão oferecer opções terapêuticas para diversas patologias dermatológicas com características de hiperinflamação ou imunossupressão. **Conclusão:** O aumento de estudos clínicos para o potencial uso de anticorpos monoclonais em dermatologia permitirá sua autorização pelas agências reguladoras e aumentará o arsenal terapêutico para condições de difícil controle.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais, terapias biológicas, biofármacos

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas terapias que incluyen a los medicamentos biológicos o biofármacos ha permitido el tratamiento de enfermedades de naturaleza inflamatoria. Estas terapias biológicas se basan en la administración exógena de diversos tipos de moléculas que modifican la respuesta del hospedero como son los anticuerpos, los receptores solubles, las citocinas o sus antagonistas, las enzimas, los antibióticos, los factores de

crecimiento o las vacunas entre otros. Su administración interfiere con el avance de la enfermedad previniendo o reduciendo las manifestaciones clínicas de ciertas patologías y disminuyendo los efectos colaterales de las terapias convencionales [1, 2].

Una de las ventajas más importantes de los biológicos es la eficacia; al interferir en el mecanismo patogénico de la enfermedad, ofrece una exclusividad terapéutica, lo que se traduce en un aumento de la eficacia clínica [3].

Entre los medicamentos biológicos más utilizados se encuentran los anticuerpos monoclonales (mAb) que son proteínas obtenidas a partir de “hibridomas”, y con ello se logra la capacidad de producción ilimitada de anticuerpos específicos para el antígeno utilizado en la inmunización. Estas proteínas son herramientas esenciales para la investigación, diagnóstico de enfermedades y actualmente son utilizados como opciones terapéuticas para varias patologías [4].

Los mAb al igual que los anticuerpos convencionales, son generalmente glicoproteínas de la clase IgG compuestas de dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas pesadas unidas por enlaces disulfuro. En cada tipo de cadena existen regiones variables de unión al antígeno (Fab) y fragmentos constantes (Fc). La interacción del mAb con el antígeno específico generalmente inhibe su actividad [5].

La obtención de los anticuerpos monoclonales se describió en la primera mitad de los años setenta por César Milstein, George J. Köhler y Niels Jerne en el Reino Unido [6]. Su trabajo fue publicado en el año de 1975 y para el año de 1984 fueron merecedores del premio Nobel por la trascendencia de la potencialidad para su uso. Estos anticuerpos ofrecen nuevas oportunidades de tratamiento de enfermedades de incidencia creciente como son el cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y degenerativas así como para el diagnóstico de laboratorio. La combinación de estos anticuerpos con radioisótopos, toxinas, citostáticos o citocinas permite aumentar su efectividad.

Los mAb se clasifican según su origen como murinos, quiméricos, humanizados o completamente humanos [7]. Progresivamente se van sustituyendo los componentes murinos por otros de origen humano para disminuir con esto su antigenicidad para lo cual se han desarrollado metodologías de DNA recombinante (Figura 1).

- a. Anticuerpos murinos: El 100% de su estructura procede del ratón, por tanto su uso está limitado principalmente al laboratorio por su capacidad inmunogénica.
- b. Anticuerpos quiméricos: Las regiones variables son de origen murino siendo humano el resto de las cadenas, estos anticuerpos se obtienen por ingeniería genética.

- c. Anticuerpos humanizados: Solamente las regiones CDR (regiones de reconocimiento al antígeno) de las partes variables de los anticuerpos proceden del ratón.
- d. Anticuerpos totalmente humanos: Su totalidad es de origen humano, reduciendo así respuestas de inmunogenicidad.

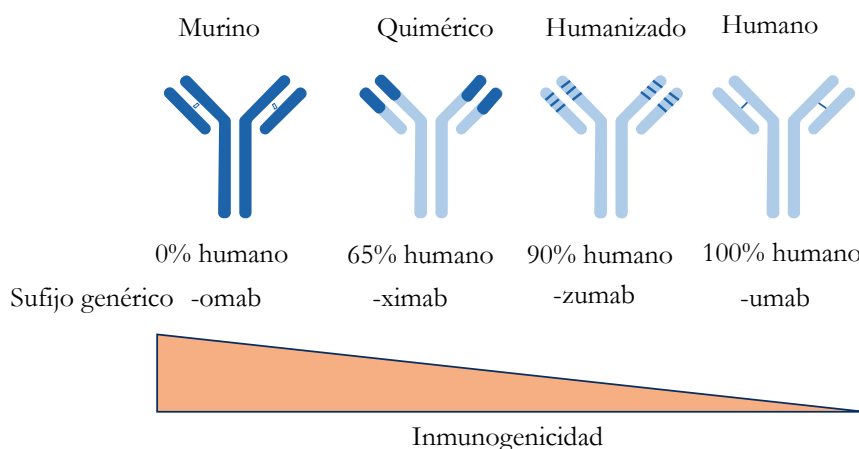


Figura 1. Tipos de anticuerpos monoclonales

La nomenclatura de estos anticuerpos utiliza el sufijo “omab” cuando se tratan de anticuerpos murinos, “ximab” en los quiméricos, “zumab” en los humanizados y “umab” en los completamente humanos.

Seguridad e Inmunogenicidad de los anticuerpos Monoclonales

La selección de un medicamento biológico (biofarmacéutico o biofármaco) es una decisión terapéutica individualizada tomando en cuenta parámetros como son la seguridad, eficacia y contraindicaciones entre otros. El principal criterio para utilizar terapia combinada de medicamentos convencionales con productos biológicos depende de la severidad de la enfermedad, fallas en la respuesta clínica de los fármacos convencionales, necesidad de control de la aplicación intravenosa, y el costo del tratamiento entre otros [8].

Antes de iniciar el tratamiento con inmunosupresores biológicos es preciso realizar una historia completa, incidiendo sobre antecedentes de tuberculosis, neoplasias, enfermedad desmielinizante o cardiopatía moderada o grave, y solicitar la determinación de un PPD, una placa de tórax, serologías de hepatitis B y C y del virus de la inmunodeficiencia humana.

Para conocer el perfil de seguridad del posible uso de los mAbs se deben consultar los resultados de los diversos estudios del desarrollo de las fases clínicas (I, II y III), porque en varios casos, aún no está autorizado su uso por que pueden generar efectos colaterales [9]. Es muy importante reconocer que los efectos secundarios de estos productos dependen ya sea de su capacidad como inmunosupresores por lo que los pacientes pueden presentar infecciones, neoplasias o reacciones de autoinmunidad debido a la presencia de proteínas que provocan diferentes grados de hipersensibilidad asociados con su capacidad inmunogénica. Aunque habría que distinguir entre las complicaciones directamente imputables a estos fármacos y las complicaciones atribuibles a la propia enfermedad o a terapias previas [8].

Es frecuente que los tratamientos utilizados de muchas afecciones dermatológicas son de uso prolongado y se hace necesario considerar la toxicidad asociada con el uso de los medicamentos tradicionales, como ejemplo se ha reportado que los antagonistas de TNF alfa evitan la hepatotoxicidad y son seguros en pacientes con funciones hepáticas comprometidas [9].

Además de las enfermedades de base que presenten los pacientes que pueden ser candidatos al uso de estos productos biológicos, se deben de considerar las reacciones indeseables o fallas en el tratamiento que pueden estar asociadas al grado de inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales.

La capacidad de respuesta inmunológica ante moléculas extrañas induce la producción de anticuerpos por tanto, la inmunogenicidad ante proteínas de origen animal puede ser un riesgo, y para el caso de los anticuerpos monoclonales éste, será mayor, en tanto la diferencia estructural con las proteínas de origen humano sea mayor.

Una de las principales causas de la baja respuesta o pérdida de eficacia de los biofármacos es su inmunogenicidad la cual depende de la aparición de anticuerpos dirigidos hacia estas moléculas, a los cuales se les denominan anticuerpos anti-fármacos (o ADA por su denominación en inglés). Esto puede llevar a inhibir la función y en consecuencia: a) La suspensión del tratamiento, b) Combinar con otros biológicos o con otros tratamientos convencionales, c) Aumentar la dosis del biológico, d) Acortar el intervalo de dosificación y e) Cambio de producto biológico.

Uno de los principales factores que pueden favorecer la inmunogenicidad de los biofármacos se relaciona con la vía de administración ya que la aplicación intravenosa favorece la tolerancia mientras que la aplicación subcutánea o intramuscular estimula la respuesta inmune secundaria [10]. Por tal motivo, conocer la posibilidad de la inmunogenicidad de cualquier fármaco es importante para tomar decisiones en pacientes tratados con productos biológicos [11-13].

Aplicaciones terapéuticas en dermatología

Los anticuerpos monoclonales que han sido aprobados por las asociaciones internacionales tienen aplicaciones terapéuticas en áreas diversas como son el cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas, así como en el tratamiento de rechazo a trasplantes. Entre las enfermedades autoinmunes se encuentran principalmente la artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple.

La inhibición de mediadores específicos para la inflamación es parte de las estrategias de tratamiento para los dermatólogos, con el uso tradicional de agentes inmunosupresores sistémicos. Sin embargo, estos productos no están libres de efectos adversos y deben manejarse con cuidado [14].

Los productos biológicos en dermatología han tenido un crecimiento exponencial en muy pocos años, Los inhibidores de TNF alfa se usan de manera rutinaria en todo el mundo. Los biofármacos utilizados en dermatología se clasifican como: Anti-TNF alfa, anticuerpos contra receptores del linfocito T, Interleucinas, inhibidores JAK, proteínas de fusión y otros (Tabla 1) [15].

Tabla 1. Clasificación de medicamentos biológicos de acuerdo a su función biológica en dermatología.

Anticuerpos Inhibidores de TNF alfa	Antireceptores específicos de células T	Interleucinas o Anticuerpos antiinflamatorios	Inhibidores de JAK	Proteínas de fusión	Otros
		Anakirna (IL-1Ra)	Ruxolitinib		Belimumab (anti BLYS)
Infliximab	Siplizumab (Anti CD 2)	Antitumor Th1 citocina (IL-2)		Alefacept LFA3 + IgG1 Bloquea CD2	Avelumab (anti PD-L1)
		Citocina Th2	Tofacitinib		Tezepelumab (anti TSLP)
Adalimumab	Orthoclone (Anti CD 4)	Dupilumab (anti IL-4a)		Denileukin difititox IL-2 + Toxina diftérica	Lanadelumab Inhibidor de calicreína
		Mepolizumab (anti IL-5)	Baricitinib		Efalizumab (anti LFA-1)

(Continúa)

Anticuerpos Inhibidores de TNF alfa	Antireceptores específicos de células T	Interleucinas o Anticuerpos antinflamatorios	Inhibidores de JAK	Proteínas de fusión	Otros
Etanercept	Rituximab (Anti CD 20)	ABX-IL8 (anti IL-8)		Abatacept CTLA4 + IgG	Omalizumab (anti IgE)
		Tenovil (IL-10)	Decernotinib		Ligelizumab (anti IgE)
Golimumab	Basiliximab, Daclizumab (Anti CD 25)	Opelvekin (IL- 11)		Onercept P55 soluble proteína de unión a TNF	SMART e IFN gamma (anti TNF gamma)
		Usterkinumab, Briakinumab (Anti IL-12 e IL 23)	Upadactinib		IFN- alfa
Certolizumab (Fragmento Fab)	Galiximab (Anti CD 80r)	Talokinumab, Lebrikizumab (anti IL-13)		Etanercept TNF alfa + IgG	IFN-gamma
		Secukinumag, Brodalumab, Ixekizumab, Bimekizumab (anti IL-17)	Bilgotinib		GM-CSF
		Guselkumab, Risankizumab, Tildrakizumab (anti IL-23)			PDFG
		Nemolizumab (anti IL-3rA)			IVIG

Abreviaturas: IL: interleucina, Th: linfocito T cooperador, Ra: receptor antagonista, TNF: factor de necrosis tumoral, JAK: cinasa janus, LFA: ligando de CD2, BLyS: proteína estimuladora de linfocitos B, PD-L1: Ligando de muerte programada, TSLP: Linfoproteína de estroma tímico, GM-CSF: factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, PDFG: factor de crecimiento estimulante de plaquetas, IVIG: pool de plasma humano fresco. Fuente: Modificado de Oka *et al.* (2019) [15].

A continuación se presenta cual ha sido la experiencia del uso y contraindicaciones de los biofármacos utilizados para enfermedades de interés dermatológico [3, 16-19]:

Psoriasis

La terapia biológica en psoriasis se recomienda cuando la terapia sistémica con metotrexato, ciclosporina o acitretina ha fallado. El problema es por sus efectos secundarios de tipo acumulativo y por daños hepáticos o renales [20].

La efectividad de los medicamentos biológicos ha sido comprobada en múltiples ensayos aleatorizados y controlados con placebo que han incluido a varios miles de pacientes. En la psoriasis, se emplean ampliamente y con éxito en el tratamiento de las formas moderadas y graves de artritis psoriásica y reumatoide [21].

El uso de etanercept (Enbrel) se aprobó en el 2002 por la FDA para el tratamiento de la artritis psoriática, posteriormente para la psoriasis en placa: alefacept (Amevive) y efalizumab (Raptiva) y adalimumab (Humira) [22].

A la fecha existen cuatro categorías de biológicos para el manejo de la psoriasis que tienen como finalidad neutralizar la acción de interleucinas proinflamatorias tales como:

- a. El factor de necrosis tumoral alfa (adalimumab, etanercept, certolizumab, infliximab)
- b. Las interleucinas 12 y 23 (ustekinumab)
- c. La interleucina 17 (brodalumab, ikekizumab, secukinumab)
- d. La interleucina 23 (guselkumab, risankizumab, tildrazizumab), no aprobada aún para artritis psoriática.

Estos fármacos tienen ventajas y desventajas entre ellas ya que se tiene el riesgo de la aparición de enfermedades fúngicas o tuberculosis y pueden exacerbar fallas cardíacas y esclerosis múltiple [23-25].

En Estados Unidos etanercept en un inicio fue el medicamento biológico más indicado; sin embargo, tras recibir la aprobación para la artritis psoriática en 2005 y para psoriasis en 2008, el uso de adalimumab aumentó de manera gradual a partir del 2011 [23].

La guía clínica británica y la francesa han propuesto a ustekinumab o adalimumab como tratamientos de primera línea [18]. A partir del 2014 ustekinumab se recetó con mayor frecuencia y es considerado el biológico recomendado en el tratamiento de psoriasis [25].

Dermatitis atópica

Antes de la aprobación del uso de biológicos para esta enfermedad, las opciones terapéuticas eran escasas principalmente con el uso de inmunosupresores con el riesgo de toxicidad en varios órganos.

El tratamiento con interferón gamma (IFN-gamma) e inmunoglobulina intravenosa ha generado resultados diversos en estudios aleatorios, doble ciego y con placebo. En el caso del uso de Efalizumab (anti LFA-1) y Alefacept (anti LFA-3/IgG) son eficientes para la dermatitis moderada y severa, así como el uso de Rituzimab (anti CD20) [25, 26]. También se han evaluado como agentes terapéuticos Omalizumab, (anti IgE) y Mepolizumab (anti IL-5) mostrándose reducciones significativas de la acción alérgica por la reducción en la infiltración de eosinófilos y depósito de tenascina [27, 28]. También se ha explorado el uso de antagonistas de TNF (infliximab) y aunque aún falta evidencia, existen reportes aislados en donde en un estudio piloto se mostró mejoría pero no se logró mantener la respuesta al tratamiento [29].

En los últimos años se ha observado un aumento en las patologías centradas en la vía de linfocitos TH2 con marcada participación de la vía TH22 y los ejes TH1/TH17 (proinflamatoria), disfunción de la barrera epidérmica, el prurito y la señalización JAK/STAT. Recientemente se ha aprobado el uso de Dupilumab -Dupixent - (anti IL-4/IL-13) para la dermatitis de moderada a severa en adulto y adolescentes quedando pendiente su aprobación para niños de 6 a 11 años [30]. Se han evaluado también los anticuerpos monoclonales tralokinumab y lebrikizumab (inhibición de IL-13) Para el tratamiento de la dermatitis atópica de moderada a grave en adultos y adolescentes a partir de 12 años de edad que son candidatos a tratamiento sistémico aún sin aprobación para esta patología a menores de edad [31, 32].

Recientemente la agencia europea del medicamento (EMA) ha aprobado el uso de los inhibidores de la cinasa de Jano (JAK) baricitinib y upadacitinib en los años 2020 y 2021 respectivamente para adultos y adolescentes lo que supone un avance en la calidad de vida de los pacientes [33]

Hidrandenitis supurativa (HS)

Los agentes biológicos se utilizan cada vez más en el tratamiento de HS de moderada a grave. Los inhibidores de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) Adalimumab e Infliximab actualmente son el segundo paso de tratamiento en caso de fracaso con el uso de antibióticos y como biológicos de segunda línea se utilizan Anakinra, Canakinumab y Ustekinumab [34, 35].

Adalimumab es el primer y único agente biológico hasta ahora aprobado por la FDA y la EMA para la HS de moderada a severa, sin embargo, Infliximab se utiliza actualmente fuera de prospecto porque aún no ha sido aprobado por la FDA para su uso.

Urticaria

Su tratamiento está limitado al uso de antihistamínicos como estándar de oro, sin embargo, con la aprobación del Omalizumab (anti IgE) para la urticaria crónica idiopática, los riesgos del tratamiento con ciclosporina como son el daño renal, hipertensión e infecciones asociadas son raros. La efectividad con este anticuerpo monoclonal en pacientes refractarios a antihistamina demostró en un estudio de fase I que 11 de 12 pacientes responden al tratamiento y 7 de ellos resuelven completamente los síntomas [36]. Rituximab, Adalimumab, Etanercept, Inflixumab y gamaglobulina endovenosa también se han utilizado en urticaria crónica espontánea, pero aún se requieren estudios clínicos controlados para demostrar su beneficio terapéutico [37].

Pénfigo

El tratamiento con Rituximab (anti CD20) es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une al receptor de superficie de los linfocitos B induciendo una lisis de los mismos, su uso ha transformado el resultado terapéutico de esta enfermedad, disminuyendo su hospitalización y en su mayoría alcanzan la remisión. Los escasos pacientes con Pénfigo vulgar (PV) y Pénfigo foliáceo (PF) tratados sugieren que puede ser una terapia válida para los enfermos refractarios a inmunosupresores [38, 39].

El Rituximab puede utilizarse como fármaco de primera línea en PV moderado y severo junto con corticoides o como tratamiento de segunda línea en pacientes que presenten falta de respuesta a otros inmunosupresores. Debe tenerse en consideración que debido al uso de este anticuerpo puede causarse reactivación y muerte por hepatitis B. La incidencia de efectos adversos aumenta a medida que se aumenta la dosis y deberá interrumpir la infusión [40, 41].

Alopecia areata

Se han reportado casos de pacientes que recibieron adalimumab y etanercept como bloqueadores de TNF alfa, alefacept (anti CD2) o efalizumab (anti CD11) que inhiben la activación de linfocitos T, sin embargo, el papel de los biológicos en esta patología aún es incierto [42, 43].

Recientemente se ha utilizado el tratamiento con tofacitinib (inhibidor de la JAK-kinasa) con la intención de controlar la cascada de citocinas para evitar la caída del cabello y proponer su reparación [44].

Pioderma gangrenoso

El uso de anti-TNF alfa (Etanercept) está indicado en pacientes con pioderma gangrenoso [45] y artritis reumatoide disminuyendo las lesiones cutáneas y sus manifestacio-

nes. Una alternativa más de tratamiento para pioderma gangrenoso es el adalimumab, un anticuerpo monoclonal humano que actúa contra TNF- α , bloqueando la interacción a los receptores p75 y p55 del TNF, fijando el complemento y produciendo lisis de células que producen TNFalfa [46].

Se ha reportado el uso exitoso en el tratamiento con infliximab (anti TNF alfa) de seis pacientes con esta patología [47]. Es el único anticuerpo monoclonal que cuenta con estudio aleatorizado controlado [48], se ha reportado además la utilidad del tratamiento con terapia hiperbárica [49].

Pitiriasis rubra pilaris

Aunque se desconoce el papel que juega el TNF alfa en esta patología pero se ha sugerido que es importante [50], por lo que se han utilizado anticuerpos monoclonales como parte del tratamiento, entre los que se encuentran infliximab, etanercept y adalimumab [3], en un estudio con 7 pacientes se demostró la remisión completa después del tratamiento con etanercept o infliximab [51, 52].

Los anticuerpos anti IL-12/IL-23 e IL-17 A (secukinumab y ustekinumab) han demostrado ser efectivos y con respuesta rápida en pacientes con los tipos I y II de esta pitiriasis [53-55].

Los tratamientos biológicos son herramientas prometedoras en el tratamiento de esta patología, sin embargo, se necesitan ensayos clínicos para evaluar mejor su eficacia y seguridad [56].

Sarcoidosis cutánea

En pacientes refractarios a corticosteroides han funcionado los antagonistas de TNF alfa como son infliximab y adalimumab estos anticuerpos actúan como agentes inmunosupresores y los pacientes que lo reciben tendrán un riesgo aumentado potencial de desarrollar linfomas o reactivar tuberculosis preexistentes [57]. Sin embargo no se han realizado estudios clínicos controlados para conocer su eficacia y seguridad para esta patología [58, 59].

Síndrome de Behcet (SB)

La inflamación asociada con la enfermedad de Behcet se puede reducir mediante medicamentos que evitan que el sistema inmunitario ataque los tejidos sanos. El empleo de fármacos anti-TNFalfa (infliximab, etanercept, adalimumab, rituximab) son la última incorporación al tratamiento del SB [60] para el caso de contraindicación, intolerancia o fracaso de tratamientos previos con corticoides e inmunosupresores. Pueden utilizarse conjuntamente con agentes inmunosupresores [61]. Los efectos secundarios podrían incluir dolor de cabeza, sarpullido en la piel y un mayor riesgo de infecciones.

Otras patologías

El estándar de oro para demostrar la eficacia de un tratamiento biológico son los estudios aleatorios controlados para muchas enfermedades dermatológicas y aunque los tratamientos en padecimientos dermatológicos son generalmente largos debido a su naturaleza crónica, las indicaciones para el tratamiento a largo plazo con biológicos tales como adalimumab, etanercept, alefacept, efalizumab e infliximab se han evaluado en periodos muy largos y aunque las respuestas son variables, su uso ha demostrado ser seguro y muy eficiente sobre todo en pacientes con psoriasis [62]. Sin embargo, aún existen otras enfermedades que carecen de buenos tratamientos biológicos como son el liquen plano, lupus cutáneo, reacciones de hipersensibilidad dérmica, escleroderma, dermatomiositis, granuloma anular, necrólisis epidérmica tóxica, y el síndrome SAPHO (del inglés Sinovitis Acne Pustulosis Hiperostosis Osteitis) [10, 17]. Esta situación puede entenderse por la ausencia de autorización del uso de estos productos por la falta de resultados satisfactorios en términos de eficacia y seguridad [63].

Anticuerpos Biosimilares en dermatología

A pesar de que los mAb son una opción terapéutica muy prometedora, su costo de producción y desarrollo hace que su acceso esté limitado, sobre todo en países en desarrollo, por este motivo, su introducción en el mercado farmacéutico se ha visto favorecida como medicamentos biosimilares [64, 65].

Los biosimilares se definen como productos biológicos similares, pero no idénticos a los productos de referencia, no son considerados como versiones genéricas de productos innovadores. A diferencia de los genéricos que deben no solamente probar su bioequivalencia, los biosimilares deben someterse a estudios clínicos comparativos de farmacocinética y farmacodinamia (Fase I) y de eficacia comparativa (fase III) [66].

El desarrollo de medicamentos biosimilares difiere en el proceso de elaboración como productos innovadores que son reconocidos por las agencias regulatorias como son la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la Food and Drug Administration (FDA). El registro de estos productos implica una nueva reglamentación sobre medicamentos genéricos que no es aplicable a este tipo de moléculas ya que la bioequivalencia se hace con productos obtenidos por síntesis química y esto no es apropiado para los productos biológicos-biotecnológicos debido a su complejidad y a su origen ya que provienen generalmente de material genético implantado en organismos vivos mediante tecnología de ADN recombinante. Por tanto, la validación y estandarización de ensayos será crucial en un futuro para su regulación [64, 67].

Actualmente se han aprobado 9 biosimilares por la EMA para la psoriasis en placa y para la hidradenitis supurativa: Amgevita, Solymbic, Cyltezo e Imraldi (sustancia

activa Adalimumab), Benepali y Erelzi (sustancia activa Etanercept), Flixabi, Inflectra y Remsima (sustancia activa Infliximab) [63].

El dermatólogo tiene que tener en cuenta varios factores a la hora de elegir un tratamiento para un paciente, entre los que se encuentra la situación y respuesta clínica, los efectos secundarios que pueden aparecer, y el coste. En función de una valoración de todo ello, el especialista elige la mejor opción.

Lesiones cutáneas asociadas con el uso de anticuerpos monoclonales

El uso anticuerpos monoclonales como antagonistas del TNF que es el producto biológico más utilizado para controlar las respuestas inflamatorias características de diversas patologías dermatológicas, ha demostrado causar el desarrollo de lesiones en piel como su órgano blanco para reacciones secundarias para este tipo de productos, además de que su uso favorece que se presente mayor susceptibilidad de enfermedades autoinmunes, cáncer e infecciones como efectos adversos lo que conduce a la suspensión del tratamiento. Por tanto, se debe analizar la administración de estos productos aprovechando la experiencia del dermatólogo para determinar las ventajas terapéuticas del producto contra sus efectos secundarios [68].

DISCUSIÓN

El avance del conocimiento de los procesos celulares, que van, desde la identificación de las moléculas de superficie y sus ligandos, que al ser activadas, generan la señales intracelulares que permiten la expresión de genes que conducen entre otras funciones a la supresión o activación del sistema inmunitario. Con esta premisa, se han desarrollado anticuerpos monoclonales (mAb) que poseen una elevada capacidad de unión específica a una gran cantidad de moléculas, gran afinidad y estabilidad y homogeneidad estructural, por estas razones, se ha propuesto su uso como posibles candidatos para la terapéutica y el diagnóstico.

Entre sus principales mecanismos de acción de los mAb se encuentran: a) Bloqueo de respuestas inhibiendo a los mediadores solubles (citocinas), b) Unión a antígenos tumorales para ser identificados y destruidos por células inmunocompetentes, c) Inducción de respuestas apoptóticas, d) Transporte de sustancias radioactivas o citostáticas y e) Potenciación de la respuesta inmune de linfocitos T por el reconocimiento de sus marcadores CD40 CD137, y CTLA-4 o de linfocitos B como el CD19 entre otros [69].

Gracias a esta diversidad de funciones y su alta especificidad, se han desarrollado varias estrategias metodológicas para obtener diversos diseños de mAb de diferente origen,

entre ellos: murinos, quiméricos, humanizados y completamente humanos para lograr evitar los posibles riesgos de inmunogenicidad que llevan a la pérdida de su actividad (neutralización) o bajar su permanencia en el organismo (aclaramiento). Y, aunque la terapéutica basada en mAb es un área en constante crecimiento, la tecnología recombinante ha permitido la obtención de moléculas cada vez más estables y menos inmunogénicas que se han utilizado en distintas áreas de la Medicina principalmente en hematología, oncología y enfermedades del sistema inmune [16] y, por ende la dermatología ha buscado en estos productos biológicos opciones terapéuticas a varias patologías hiperinflamatorias.

Sin embargo, a pesar de los grandes avances en ensayos clínicos y del uso de productos biofarmacéuticos en dermatología, la información a la fecha aún es incompleta e insatisfactoria ya que faltan estudios clínicos y aún existen muchas enfermedades dermatológicas sin este tipo de tratamientos, en parte porque estos productos no son eficientes, su costo es excesivo, presentan reacciones secundarias/adversas o debido a que su administración debe aplicarse por vía IV bajo supervisión médica.

CONCLUSIÓN

Debido a que el nivel de evidencia experimental y clínica para el uso de anticuerpos monoclonales en varias patologías dermatológicas es muy bajo, la mayoría de estos productos biológicos no han sido aprobados por las instancias regulatorias por no contar con estudios controlados o por no demostrar la eficacia y seguridad requeridas, por lo que muy pocos son los anticuerpos monoclonales que aparecen en el Vademécum para uso dermatológico. De ahí la importancia de presentar los avances de los resultados de diferentes ensayos clínicos que podrían ser candidatos útiles en la terapéutica dermatológica. Sin embargo, el análisis costo-beneficio aunado a la creciente evidencia de resultados de los ensayos clínicos se espera que más adelante este tipo de productos sean considerados como opciones terapéuticas o en combinación con las terapias tradicionales en los que el tratamiento convencional fracasa o crea una morbilidad importante en los pacientes. Por tanto, se espera que el desarrollo y uso de estos productos biotecnológicos logre a futuro que el tratamiento de padecimientos dermatológicos permita alcanzar la medicina personalizada [70].

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. J.L. Sánchez-Carazo, Presente y futuro de la terapia biológica en Dermatología, *Actas Dermo-Sifiliográficas*, **99**(2), 89-90 (2008). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(08\)74629-5](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(08)74629-5)
2. F. De Mora, R. Torres, Medicamentos derivados de la biotecnología: ¿Qué son? Una perspectiva farmacológica e histórica, *Diagnóstico* (Perú), **49**(4), 149-157 (2010). URL: <https://www.fihu.org.pe/revista/numeros/2010/oct-dic/149-158.html>
3. D. Chandler, A. Bewley, Biologics in Dermatology, *Pharmaceuticals*, **6**(4), 557-578 (2013). Doi: <https://doi.org/10.3390/ph6040557>
4. A. García-Merino, Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos, *Neurología*, **26**(5), 301-306 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.10.005>
5. M. Superson, K. Szmyt, K. Szymańska, *et al.*, Clinical application of monoclonal antibodies in targeted therapy, *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **17**(4), 338-346 (2019). Doi: <https://doi.org/10.15584/ejcem.2019.4.9>
6. G. Köhler, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **256**, 495-497 (1975). Doi: <https://doi.org/10.1038/256495a0>
7. N.P. Machado, G.A. Tellez, J.C. Castaño, Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas, *Infectio*, **10**(3), 186-197 (2006). URL: https://www.revistainfectio.org/P_OJS/index.php/infectio/article/view/174/150
8. T.T. Hansel, H. Kropshofer, T. Singer, J.A. Mitchell, A.J.T. George, The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*, **9**, 325-338 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1038/nrd3003>
9. B. Casanova-Estruch, Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment, *Neurología*, **28**(3), 169-178 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2010.06.004>
10. M.L. Sánchez, Biofármacos, *ByPC*, **84**(3), 44-51 (2020). URL: <https://www.revistabypc.org.ar/index.php/bypc/article/view/23/177>

11. D.W. Scott, A.S. De Groot, Can we prevent immunogenicity of human protein drugs? *Annals of Rheumatic Diseases*, **69**(Suppl. 1), i72-76 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1136/ard.2009.117564>
12. C.M. Blattner, S.P. Chaudhari, J. Young III, J.E. Murasem A dermatologist guide to immunogenicity, *International Journal of Women's Dermatology*, **2**(3), 77-84 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2016.05.001>
13. R. Rivera, F. Vanaclocha, P. Herranz, ¿Es útil el estudio de la inmunogenicidad en los tratamientos biológicos en psoriasis? *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, **43**(1), 10-17 (2015). URL: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2015/mc151c.pdf>
14. N.V. Sehgal, D. Pandhi, A. Khurana. Biologics in Dermatology: An integrated review. *Indian Journal of Dermatology*, **59**(5), 425-441 (2014). URL: https://journals.lww.com/ijod/fulltext/2014/59050/biologics_in_dermatology__an_integrated_review.1.aspx
15. A.D. Oka, T.P. Vaidya, P. Potdar, Biologics in dermatology, *International Journal of Research in Dermatology*, **5**(4), 917-926 (2019). Doi: <http://doi.org/10.18203/issn.2455-4529.IntJResDermatol20194697>
16. M. Pellicer-Corbí, S.E. García-Ramos, P. García-Poza, F. Ramos-Díaz, S.M. Matoses-Asensio, Actualización en terapéutica de anticuerpos monoclonales, *Ars Pharmaceutica*, **55**(1), 8-22 (2014). URL: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/4278/4194>
17. S.M. Veilleux, H.N. Shear, Biologics in patients with skin diseases, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **139**(5), 1423-1430 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.012>
18. C.H. Smith, Z.Z.N. Yiu, T. Bale, *et al.*, British Association of Dermatologists guidelines for biologic therapy for psoriasis 2020: A rapid update, *British Journal of Dermatology*, **183**(4), 628-637 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1111/bjd.19039>
19. P. Chames, M. Van Regenmortel, E. Weiss, D. Baty, Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future, *British Journal of Pharmacology*, **157**(2), 220-233 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>

20. A. Villareal-Martínez, M. Gómez-Flores, J. Ocampo-Candiani, Agentes biológicos en el tratamiento de psoriasis, *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, **10**(3), 198-204 (2012). URL: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2012/dcm123h.pdf>
21. J.M. Casanova, V. Sanmartin, R.M. Martí, M. Ferran, R.M. Pujol, M. Ribera, Tratamiento de la psoriasis en placas moderada y grave con etanercept, *Piel*, **24**(2), 105-113 (2009). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0213-9251\(09\)70337-5](https://doi.org/10.1016/S0213-9251(09)70337-5)
22. A. Blauvelt, Ixekizumab: A new anti-IL-17A monoclonal antibody therapy for moderate-to severe plaque psoriasis, *Expert Opinion on Biological Therapy*, **16**(2), 255-263 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1517/14712598.2016.1132695>
23. Y.Y. Syed, Ixekizumab: A Review in moderate to severe plaque psoriasis, *American Journal of Clinical Dermatology*, **18**, 147-158 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0254-4>
24. E. González-Guerra, Elección de fármaco biológico en psoriasis moderada-grave, Protocolo, *Más Dermatología*, **17**, 5-15 (2012). URL: <https://www.masdermatologia.com/PDF/0105.pdf>
25. D.P. Ruiz-Genaoa, G. Carretero, R. Rivera, *et al.*, Cambios en las tendencias de la prescripción y causas de la interrupción en los tratamientos biológicos indicados en la psoriasis durante los primeros 10 años. Datos obtenidos del registro español Biobadaderm, *Actas Dermo-Sifilográficas*, **111**(9), 752-760 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2020.05.008>
26. D. Simon, S. Hösli, G. Kostylina, N. Yawalkar, H.-U. Simon, Anti CD20 (rituzimab) treatment improves atopic eczema, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **121**(1), 122-128 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.11.016>
27. L.E. Sheinkoph, A.W. Rafi, L.T. Do, R.M. Katz, W.B. Klaustermeyer, Efficacy of omalizumab in the treatment of atopic dermatitis: A pilot study, *Allergy and Asthma Procedures*, **29**(5), 530-537 (2008). Doi: <https://doi.org/10.2500/aap.2008.29.3160>
28. S. Phipps, P. Flood-Page, A. Menizies-Gow, Y.E. Ong, A.B. Kay, Intravenous anti IL-5 monoclonal antibody reduces eosinophils and tenascin deposition in allergen-challenged human atopic skin, *Journal of Investigative Dermatology*, **122**(6), 1406-1412 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22619.x>

29. A. Jacobi, C. Antoni, B. Manger, G. Schuler, M. Hertl, Infliximab in the treatment of moderate or severe atopic dermatitis, *Journal of the American Academy of Dermatology*, **52**(3), 522-526 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.11.022>
30. S. Ferreira, T. Torres, Dupilumab para el tratamiento de la dermatitis atópica, *Actas Dermo-Sifilográficas*, **109**(3), 230-240 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2017.10.012>
31. M. Munera-Campos, J.M. Carrascosa, Innovación en dermatitis atópica: de la patogenia a la terapéutica, *Actas Dermo-Sifilográficas*, **111**(3), 205-221 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2019.11.002>
32. V.P. Vera-Giglio, J.P. Morales-Etcheverry, F. Valenzuela-Ahumada, Presente, futuro del tratamiento biológico y moléculas pequeñas en la dermatitis atópica, *Revista Chilena de Dermatología*, **37**(1), 12-18 (2021). URL: <https://rcderm.org/index.php/rcderm/article/viewFile/363/402>
33. J.C. Aguillón, J. Contreras, A. Dotte, A. Cruzat, D. Catalán, L. Salazar, *et al.*, Nuevas armas inmunológicas para la medicina del siglo XXI: Terapia biológica basada en el uso de anticuerpos monoclonales de última generación, *Revista Médica de Chile*, **131**(12), 1445-1453 (2003). Doi: <https://doi.org/10.4067/S0034-98872003001200013>
34. L. García-Valdés, J.F. Flores-Ochoa, R. Arenas, Hidrosadenitis supurativa. Parte II. Tratamiento en medidas generales, médico y quirúrgico, *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, **16**(1), 63-69 (2017). URL: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm181j.pdf>
35. Consenso Nacional de Hidradenitis supurativa, Sociedad Argentina de Dermatología, *Guía de tratamiento 2019*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2019. 28 p. URL: <https://sad.org.ar/wp-content/uploads/2019/12/Consenso-Hidradenitis-Supurativa-2019-14112019.pdf>
36. A.P. Kaplan, K. Joseph, R.J. Maykut, G.P. Geba, R.K. Zeldin, Treatment of chronic autoimmune urticaria with omalizumab, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **122**(3), 569-573 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.07.006>
37. R. Aguilera-Insunza, H. Correa, C. Díaz, M.A. Marinovic, F. Valenzuela, Guía clínica chilena de urticaria crónica espontánea, *Revista Médica de Chile*, **146**(11), 1334-1342 (2018). Doi: <http://doi.org/10.4067/S0034-98872018001101334>

38. J. Sánchez-Pérez, A. García-Diez, Pénfigo, *Actas Dermo-Sifilográficas*, **96**(6), 329-356 (2005). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(05\)73090-8](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(05)73090-8)
39. A. Alvarez-Abella, S. Martín-Sala, N.I. Figueras, A. Juglà, Tratamiento de los pénfigos, *Piel*, **27**(2), 90-97 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.piel.2011.07.013>
40. Sociedad Argentina de Dermatología, *Guía de manejo de los pénfigos 2020*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2020. 54 p. URL: <https://sad.org.ar/wp-content/uploads/2020/06/Guias-de-manejo-de-penfigo-2020-.pdf>
41. A. España, E. Ornilla, C. Panizo, Rituximab in dermatology, *Actas Dermo-Sifilográficas*, **104**(5), 380-392 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2013.04.002>
42. B.E. Strober, K. Menon, A. McMichael, *et al.*, Alefacept for severe alopecia areata: A randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Archives of Dermatology*, **145**(11), 1262-1266 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2009.264>
43. G. Kolde, H. Meffert, E. Rowe, Successful treatment of alopecia areata with efalizumab, *Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology*, **22**(12), 1519-1520 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2008.02665.x>
44. A. Gilhar, A. Keren, R. Paus, JAK inhibitors and alopecia areata, *The Lancet*, **393**(10169), 318-319 (2019). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32987-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32987-8)
45. B.E. Cruz-Toledo, R. Tovar-Franco, L. Juárez-Navarrete, Pioderma gangrenoso. Revisión de la bibliografía, *Medicina Interna Mexico*, **27**(6), 609-615 (2011). URL: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2011/mim116m.pdf>
46. D.B Roy, E.T. Conte, D.J. Cohen, The treatment of pyoderma gangrenosum using etanercept. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **54**(3), s128-s134 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.10.058>
47. J.E. Mooij, D.C. van Rappard, J.R. Mekkes, Six patients with pyoderma gangrenosum successfully treated with infliximab, *International Journal of Dermatology*, **52**(11), 1418-1420 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05201.x>

48. F. Soto-Vilches, C. Vera-Kellet, Pioderma gangrenoso: terapias clásicas y emergentes, *Medicina Clínica* (Barcelona), **149**(6), 256-260 (2017). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.04.013>
49. A.E.R. Herfarth, D. Martínez-Ramos, J. Nomdedeu-Guinot, J.L. Salvador-Sanchis, Oxígeno hiperbárico como tratamiento adyuvante en el pioderma gangrenoso, *Cirugía Española*, **85**(5), 319-321 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2008.09.015>
50. P.M. Mancilla-Gudiel, R. Arenas, Pitiriasis rubra pilar: una revisión, *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, **18**(1), 53-60 (2020). URL: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2020/dcm201m.pdf>
51. Y.H. Zhang, Y. Zhou, N. Ball, M.-W. Su, J.-H. Xu, Z.-Z. Zheng, Type I pityriasis rubra pilaris: Upregulation of tumor necrosis factor alpha and response to adalimumab therapy, *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, **14**(4), 185-188 (2010). Doi: <https://doi.org/10.2310/7750.2010.09023>
52. H. Müller, C. Gattringer, B. Zelger, R. Höpfl, K. Eisendle, Infliximab monotherapy as first-line treatment for adult-onset pityriasis rubra pilaris: Case report and review of the literature on biologic therapy, *Journal of the American Academy of Dermatology*, **59**(5), S65-S70 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.05.037>
53. S. Roenneberg, T. Biedermann, Pityriasis rubra pilaris: Algorithms for diagnosis and treatment, *Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology*, **32**(6), 889-898 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1111/jdv.14761>
54. R. Ruiz-Villaverde, D. Sánchez-Cano, Successful treatment of type 1 pityriasis rubra pilaris with ustekinumab therapy, *European Journal of Dermatology*, **20**(5), 630-631 (2010). Doi: [10.1684/ejd.2010.1004](https://doi.org/10.1684/ejd.2010.1004)
55. D. Schuster, A. Pfister-Wartha, L. Bruckner-Tuderman, C.M. Schempp, Successful treatment of refractory pityriasis rubra pilaris with secukinumab, *JAMA Dermatology*, **152**(11), 1278-1280 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1001/jama-dermatol.2016.3885>
56. M. Napolitano, D. Abeni, B. Didona, Biologics for pityriasis rubra pilaris treatment: A review of the literature, *Journal of the American Academy of Dermatology*, **79**(2), 353-359 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.036>

57. C.F. Gatti, P. Prah, P. Troielli, R. Schroh, Sarcoidosis: Un enfoque global, *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, **36**(4), 165-182 (2008). URL: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2008/mc084b.pdf>
58. K.A. Wanat, M. Rosenbach, Case series demonstrating improvement in chronic cutaneous sarcoidosis following treatment with TNF inhibitors, *Archives of Dermatology*, **148**(9), 1097-1100 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2012.1322>
59. C. Tuchinda, H.K. Wong, Etanercept for chronic progressive cutaneous sarcoidosis, *Journal of Drugs in Dermatology*, **5**(6), 538-540 (2006). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16774106/>
60. A.M. Londoño-García, D.L. Hernández-Navarro, Enfermedad de Behçet, *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, **31**(3), 149-160 (2003). URL: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2003/mc033b.pdf>
61. R. García-Palenzuela, J. Graña-Gil, M. Varela-Arias, M. Tovar-Bobo, Actualización de la enfermedad de Behçet. A propósito de 2 casos en atención primaria, *Semergen – Medicina de Familia*, **38**(1), 33-39 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.semereg.2011.07.011>
62. L. Castello-Soccio, A.S. Van Voorhees, Long-term efficacy of biologics in dermatology, *Dermatologic Therapy*, **22**(1), 22-33 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2008.01213.x>
63. J.E. Graves, K. Nunley, M.P. Heffernan, Off-label uses of biologics in dermatology: Rituximab, omalizumab, infliximab, etanercept, adalimumab, efalizumab, and alefacept (part 2 of 2), *Journal of the American Academy of Dermatology*, **56**(1), e55-e79 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.07.019>
64. G. Sanclemente-Mesa, Lo que debe saber el dermatólogo sobre los medicamentos biológicos y los biosimilares, *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología*, **19**(4), 321-329 (2011). URL: <https://www.revista.asocolderma.org.co/index.php/asocolderma/article/view/353/329>
65. M.A. Calleja-Hernández, J.M. Martínez-Sesmero, B. Santiago-Josefat, Biosimilares de anticuerpos monoclonales en enfermedades inflamatorias y cáncer: situación actual, retos y oportunidades, *Farmacia Hospitalaria*, **44**(3), 100-108 (2020). URL: <https://revistafarmaciahospitalaria.sefh.es/gdcr/index.php/fh/article/view/11280/11280esp>

66. M.M. Constantin, C.M. Cristea, T. Taranu, Stefana Bucur, T. Constantin, A. Dinu, M. Jinga, I.E. Nita, Biosimilars in dermatology: The wind of change (Review), *Experimental and Therapeutic Medicine*, **18**(2), 911-915 (2019). Doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7505>
67. H. Schellekens, Biosimilar therapeutics—What do we need to consider? *Nephrology Dialysis Transplantation Plus*, **2**(Suppl. 1), i27-i36 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfn177>
68. M.V. Hernández, M. Meineri, R. Sanmarti, Lesiones cutáneas y terapia biológica con antagonistas del factor de necrosis tumoral, *Reumatología Clínica*, **9**(1), 53-61 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2012.04.007>
69. B. Pérez-Suárez, Novedades en dermatitis atópica: ya están aquí los inhibidores de la JAK baricitinib y upadacitinib, *Más Dermatología*, **37**, 37-38 (2022). Doi: <https://doi.org/10.5538/1887-5181.2022.37.37>
70. E. Guevara-Sanginés, El desarrollo de los biotecnológicos en el tratamiento de enfermedades dermatológicas, un camino hacia la medicina personalizada, *Dermatología Revista Mexicana*, **65**(1), 1-2 (2021). Doi: <https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v65i1.5043>

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

L.E. Castrillón-Rivera, A. Palma-Ramos, J.I. Castañeda-Sánchez, El uso de anticuerpos monoclonales en dermatología, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 44-66 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.110799>

Water quality and health risk assessment of metals within the vicinity of Gosa dumpsite, Abuja Nigeria

Joseph Omada ¹, Emeka Chima Ogoko ^{2*}, Henrietta Kelle ², Gideon Yomi ³

¹Department of Environmental Science, National Open University of Nigeria, Jabi Abuja, Nigeria

²Department of Chemistry, National Open University of Nigeria, Jabi Abuja, Nigeria

³Department of Geology, Kogi State University Anyigba, Nigeria

*Corresponding author E-mail: eogoko@noun.edu.ng

Received: August 15, 2023

Corrected: December 22, 2023

Accepted: January 4, 2024

SUMMARY

Introduction: The quality of surface and groundwater and associated public health issues have not received the attention it deserves among the communities within the vicinity of Gosa dumpsite, Abuja, Nigeria. **Aim:** To assess the physicochemical quality and potential health risks of heavy metals in drinking water resources around the Gosa dumpsite, Abuja, Nigeria. **Methodology:** Analysis of total dissolved solids and dissolved oxygen was done using the gravimetric method and azide modification of Winkler's method respectively. Sulphates, nitrates and fluorides concentrations were determined by UV/Vis spectrophotometric methods. Chlorides were determined by argentometric method. Carbonates were analysed using titrimetric method while analysis of metal concentrations was by atomic absorption spectrophotometer. **Results:** The mean levels of turbidity, DO, Fe, Pb, Cd, As, Cr and Mn exceeded the maximum permissible limits. Among all the metals in this study, Fe, Pb, Cd, Cr, Ni, and Mn had metal indices greater than 1.0 in both surface water and groundwater while the water quality index (WQI) exceeded the threshold value of 100. The mean hazard quotient for Pb, Cd and As exceeded one, while hazard index (HI) was higher than threshold value (1.0) in all the metals evaluated indicating associated potential chronic health risks. The study revealed that incremental lifetime cancer risks for Cd, As, Cr and Ni were higher than the acceptable safe limits ($< 1 \times 10^{-4}$). **Conclusion:** The higher water index of water revealed that water was polluted and unsafe for drinking. Incremental lifetime

cancer risks for Cd, As, Cr and Ni exceeded the safe limits ($< 1 \times 10^{-4}$), indicating a potential cancer risk associated with ingestion of these carcinogenic metals through consumption of water by adult population.

Keywords: water quality index, hazard quotient, hazard index, incremental lifetime cancer risks

RESUMEN

Evaluación de la calidad del agua y los riesgos para la salud de los metales en las proximidades del vertedero de Gosa, Abuja, Nigeria

Introducción: La calidad del agua superficial y subterránea y los problemas de salud pública asociados no han recibido la atención que merece entre las comunidades cercanas al vertedero de Gosa, Abuja, Nigeria. **Objetivo:** Evaluar la calidad fisicoquímica y los riesgos potenciales para la salud de los metales pesados en los recursos de agua potable alrededor del vertedero de Gosa, Abuja, Nigeria. **Metodología:** El análisis de sólidos disueltos totales y oxígeno disuelto se realizó mediante el método gravimétrico y modificación con azida del método de Winkler respectivamente. Las concentraciones de sulfatos, nitratos y fluoruros se determinaron mediante métodos espectrofotométricos UV/Vis. Los cloruros se determinaron por el método argentométrico. Los carbonatos se analizaron mediante el método titrimétrico mientras que el análisis de las concentraciones de metales se realizó mediante espectrofotómetro de absorción atómica. **Resultados:** Los niveles medios de turbidez, DO, Fe, Pb, Cd, As, Cr y Mn superaron los límites máximos permisibles. Entre todos los metales en este estudio, Fe, Pb, Cd, Cr, Ni y Mn tuvieron índices metálicos superiores a 1,0 tanto en aguas superficiales como subterráneas, mientras que el índice de calidad del agua (ICA) superó el valor umbral de 100. El peligro medio El cociente de Pb, Cd y As superó uno, mientras que el índice de peligrosidad (HI) fue superior al valor umbral (1,0) en todos los metales evaluados, lo que indica posibles riesgos crónicos asociados para la salud. El estudio reveló que los riesgos incrementales de cáncer a lo largo de la vida para Cd, As, Cr y Ni eran superiores a los límites de seguridad aceptables ($< 1 \times 10^{-4}$). **Conclusión:** El índice de agua más alto reveló que el agua estaba contaminada y no era apta para beber. Los riesgos incrementales de cáncer a lo largo de la vida para Cd, As, Cr y Ni excedieron los límites seguros ($< 1 \times 10^{-4}$), lo que indica un riesgo potencial de cáncer asociado con la ingestión de estos metales cancerígenos a través del consumo de agua por parte de la población adulta.

Palabras clave: índice de calidad del agua, cociente de peligro, índice de peligro, riesgos incrementales de cáncer a lo largo de la vida

RESUMO

Avaliação da qualidade da água e do risco à saúde de metais nas proximidades do lixão de Gosa, Abuja, Nigéria

Introdução: A qualidade das águas superficiais e subterrâneas e as questões de saúde pública associadas não têm recebido a atenção que merecem entre as comunidades nas proximidades do lixão de Gosa, Abuja, Nigéria. **Objetivo:** Avaliar a qualidade físico-química e os potenciais riscos para a saúde dos metais pesados nos recursos de água potável em torno do lixão de Gosa, Abuja, Nigéria. **Metodologia:** A análise do total de sólidos dissolvidos e oxigênio dissolvido foi realizada utilizando o método gravimétrico e a modificação da azida do método de Winkler, respectivamente. As concentrações de sulfatos, nitratos e fluoretos foram determinadas por métodos espectrofotométricos UV/Vis. Os cloretos foram determinados pelo método argentométrico. Os carbonatos foram analisados pelo método titulométrico enquanto a análise das concentrações metálicas foi realizada por espectrofotômetro de absorção atômica. **Resultados:** Os níveis médios de turbidez, OD, Fe, Pb, Cd, As, Cr e Mn ultrapassaram os limites máximos permitidos. Entre todos os metais neste estudo, Fe, Pb, Cd, Cr, Ni e Mn apresentaram índices metálicos superiores a 1,0 nas águas superficiais e subterrâneas, enquanto o índice de qualidade da água (IQA) excedeu o valor limite de 100. O perigo médio o quociente para Pb, Cd e As excedeu um, enquanto o índice de perigo (HI) foi superior ao valor limite (1,0) em todos os metais avaliados, indicando potenciais riscos crônicos à saúde associados. O estudo revelou que os riscos incrementais de cancro ao longo da vida para Cd, As, Cr e Ni foram superiores aos limites de segurança aceitáveis ($< 1 \times 10^{-4}$). **Conclusão:** O índice hídrico mais alto da água revelou que a água estava poluída e imprópria para beber. Os riscos incrementais de câncer ao longo da vida para Cd, As, Cr e Ni excederam os limites seguros ($< 1 \times 10^{-4}$), indicando um risco potencial de câncer associado à ingestão destes metais cancerígenos através do consumo de água pela população adulta.

Palavras-chave: índice de qualidade da água, quociente de perigo, índice de perigo, riscos incrementais de câncer ao longo da vida

INTRODUCTION

Surface water and groundwater pollution has constituted serious public health concerns in suburban and urban areas of most developing countries including Nigeria [1].

This is a consequence of increasing population explosion or growth, and unauthorized discharge of untreated sewage and industrial effluent. Surface and groundwater adjacent to waste disposal sites are at risk of being contaminated. Pollutants are washed into surface water or leached into groundwater through the aquifer, thereby contaminating these water resources [2, 3]. Municipal solid waste is generated in most cities of Nigeria due to increasing consumption of household resources, solid wastes, hazardous wastes, radioactive wastes, agricultural and sewage [4]. Solid waste management has become one of the most persistent environmental challenges faced by mainly the urban areas in Nigeria. With an estimated population of over 200 million, Nigeria appeared to be the greatest producer of solid waste in Africa [5-7]. Municipal waste disposal methods in Nigeria comprise open dumping, open burning, incineration, unregulated landfills, composting, and dumping into drain channels, streams and rivers. The most common method of municipal waste disposal in Nigeria is the open dumps consisting of open holes or fields on the ground where trash, inert and recyclable and non-recyclable wastes are dumped. Burning of wastes controls bacterial activities and is an effective weight volume reduction method, but a vast source of air pollutants [8].

Groundwater and surface water are the main source of water for drinking and other domestic purposes without any form of treatment in most urban and sub-urban regions in Nigeria [9]. This is partly because the removal of pollutants in water followed a somewhat complex process in addition to the high cost involved [10-14]. There is a community of residents that live in the Gosa dumpsite which depends on shallow wells for drinking water. Also, inhabitants leaving adjacent to the solid waste disposal sites called Jiyita drink water from a lake that drains from the dumpsite and three boreholes [5, 15]. Heavy metals could impact the water quality within the communities; hence it becomes expedient that there should be periodic monitoring.

The present study was designed to determine the levels of physicochemical properties and concentrations of eleven heavy metals in drinking water (surface water and groundwater) within the vicinity of the Gosa dumpsite and to evaluate the health risks associated with the oral ingestion of heavy metals. The outcome of this research will make available some awareness of the degree of heavy metal pollution in the water resources at Gosa for the relevant authorities to proffer mitigation measures.

METHODS

Study area

Samples were collected in March 2022 within vicinity of the Gosa dumpsite and Jiyita village. The sampling stations were accessed through Idu -Airport Road in Abuja. The

Gosa dumpsite is located off the Nnamdi Azikiwe Airport Road, Abuja within coordinates N09° 01.270' E007° 19.59' and N09° 01 173' E007° 20.510. The sample description and the map of the study area are shown in Table 1 and Figure 1 respectively.

Table 1. Description of sample locations, coordinates and elevation

Sample ID	Coordinates of sample locations		Elevation (m)
	Latitude	Longitude	
SW1	N09° 01 32.7'	E007° 20 15.5'	391
SW2	N09° 01 20.7'	E007° 20 19.6'	378
SW3	N09° 01 11.1'	E007° 20 21.8'	376
SDP1	N09° 01 10.8'	E007° 20 21.9'	373
SDP2	N09° 01 15.3'	E007° 20 12'	390
JL1	N09° 01 08.8'	E007° 20 07.5'	392
JL2	N09° 01 08.8'	E007° 20 07.6'	400
BH1	N09° 01 43.1'	E007° 20 12.9'	414
BH2	N09° 01 00'	E007° 20 4.2'	392
BH3	N09° 01 00'	E007° 20 6.7'	385

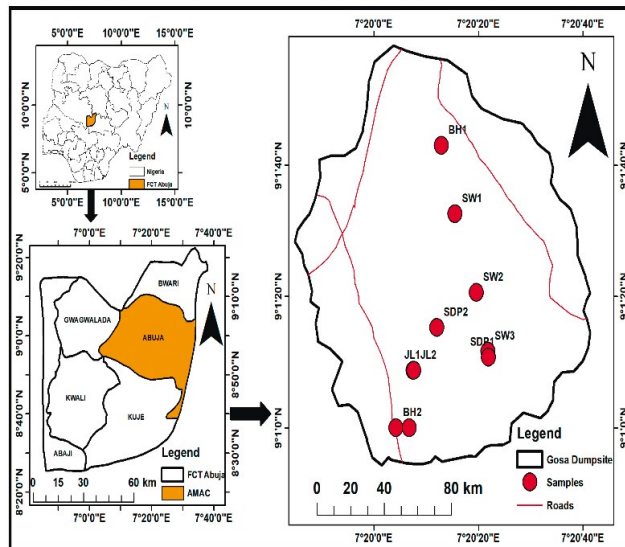


Figure 1. Location map of Gosa dumpsite, Abuja Nigeria

Sample collection and pre-treatment

A total of twenty water samples were collected from the study area during the dry season in March 2022. These include fourteen (14) surface water and six (6) groundwater samples. Three (6) surface water samples (SW1, SW2, SW3, SW4, SW5 and SW6) were collected from the flowing stream within the waste dumpsite at different points of almost equal intervals, starting from its source. Four (4) other surface water samples two each from (SDP1 and SDP2) were collected from very shallow hand dug just besides the flowing stream, while the last two (2) surface water samples (JL1 and JL2) were collected from a minor lake in Jiyita community. The groundwater samples were from one borehole within the perimeter of the waste dumpsite, and two different boreholes within the Jiyita community which is located at the western flank behind the dumpsite fence. The water samples were collected at the same time in a clean 2 litre transparent sample container. The residence time of borehole water in the overhead tank was less than 24 hours for each sample at the time of collection. Physical parameters such as temperature, pH, electrical conductivity, total dissolved solids, and dissolved oxygen were measured in Insitu, in triplicate using the appropriate instrument. The samples were then transported to the laboratory and stored at 4 °C before analysis.

Data Analysis

Metal Index

The metal index was calculated from the formula in equation 1 [16].

$$MI = \sum \frac{C}{MAC} \quad (1)$$

where, MI is the metal index; C is the concentration of each element in solution; MAC is the maximum of allowed concentration of each element. A metal index of less than 1.0 implies no pollution while a metal index greater than 1.0 revealed that pollution has occurred concerning that metal.

Water Quality Index (WQI)

The computed water quality index evaluates the suitability of water for drinking purposes; hence the formulae below were used to calculate the water quality rating scale, relative weight and Water Quality Index (WQI) respectively [16].

The water quality rating and water quality index were computed from the formula in equation 2 and 4 respectively [16, 17].

$$q_i = \frac{C_i}{S_i} \times 100 \quad (2)$$

Where q_i , C_i , and S_i denote the quality rating scale for parameter i , concentration for parameter i and the standard value of i parameter correspondingly. The relative weight was calculated thus;

$$w_i = \frac{1}{S_i} \quad (3)$$

Lastly, the water quality index was computed thus;

$$WQI = \sum q_i w_i / \sum w_i \quad (4)$$

Health risks assessment

Estimated daily intake, Hazard quotient (HQ), Hazard index, and Incremental life-time cancer risk were calculated with the formula below to access the health risks through ingestion of water.

Estimated daily intake

The estimated daily intake (mg/kg/day) is calculated with the formula in equation 5 [17, 18].

$$EDI = \frac{CR}{BW} \times IR \quad (5)$$

where CR is the metal concentration, IR and BW signify the daily water consumption rate and the mean body weight of Nigerians respectively. 64 kg and 2.0 L were the average body weights of Nigerian adults and the daily ingestion rate through oral consumption of water in adult Nigerian respectively [19].

Hazard quotient (HQ)

Non-carcinogenic health risks of heavy metals were assessed by calculating the HQ [20, 21].

$$HQ = \frac{EDI}{RfD} \quad (6)$$

where RfD refers to oral reference dose which is the estimated maximum permissible health risk related to daily human consumption or contact with heavy metals. RfD can be expressed in mg/kg/day [17, 18]. The collective effects of more than two heavy metals on the potential human health risk is called hazard index (HI). HI is calculated with the formula in equation 7 [15-18].

$$HI = \sum HQ \quad (7)$$

HI <1, indicates no potential health risk, whereas HI >1 indicates potential chronic health risk [15-18].

Carcinogenic risk

An index that is appropriately used to evaluate the carcinogenic risk is the incremental lifetime cancer risk [15-18]. Incremental lifetime cancer risk (ILCR) is expressed with the formula in equation 8 [22, 23].

$$ILCR = CDI \times CSF \quad (8)$$

where CDI is the chronic daily intake of carcinogenic chemical substances (mg/kg bw/day). CSF is the cancer slope factor, which is estimated with the formula in equation 9 [22, 23].

$$\text{But, } CDI = \frac{EDI \times EF \times ED}{AT} \quad (9)$$

where, EF is the exposure frequency in days/year (365 days per year), ED is the exposure duration in years or life expectancy. The life expectancy for adult Nigerians is 54 years [24]. AT is the average time or period of exposure which is 365 days per year multiplied by 54 years (19,710 days.) while CF is the correction factor [25].

Determination of physicochemical properties

Triplicate values of the physicochemical parameters were measured using the appropriate instruments and the mean of each was recorded.

Analysis of pH and temperature

The pH of the water samples was measured on the sampling spot with the aid of PHS-25 Laboratory Water pH Meter. Prior to the measurement, the pH meter was

recalibrated with buffer solutions of pH 4 and 9 respectively. The pH meter was used to measure the temperature while 110°C mercury thermometer was used to validate all temperature readings.

Electrical Conductivity

A high-powered microcomputer conductivity meter JENWAY 40710 model HI 9032 with a degree of accuracy of 0.01 was used to measure the conductivity of the water samples in situ. The instrument was initially calibrated using standard solution of conductivities 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Duplicate values were taken and units were in microsiemens per centimetre.

Total dissolved solids (TDS)

Analysis of TDS was performed by gravimetric method according to the American public health association [26]. 20 cm^3 of sample was filtered into a clean pre-weighed 100 cm^3 beaker and dry to a constant weight in the oven set at 105 °C and TDS was obtained by weight difference relating it to sample volume.

Dissolved Oxygen (DO)

Dissolved Oxygen (DO) was measured by azide modification of Winkler's method using Hanna 83200 multiparameter [27, 28]. The sample was filled in a 60 mL glass bottle and 5 drops of reagent A (HI 93732A-0) and 5 drops of B (HI 93732B-0). The bottle was then covered and inverted severally. The orange yellow solution was allowed to stand for two minutes followed addition of 10 drops of HI 93732C-0 and inverted severally until flocculent dissolved completely. The prepared sample was transferred into the cuvette and DO was measured after untreated water sample was used to zeroed the meter.

Turbidity

Turbidity of the water samples was measured in situ with a microprocessor turbidimeter JENWAY 3071, model HI93703 (0.0001 degree of accuracy). The instrument was first calibrated by dipping the probe into standard solution with turbidity values of 0.00 and 10.00 Nephelometric Turbidity Unit (NTU) before measuring the turbidity values of the samples.

Sulphate

Sulphate determination was by the turbidimetric method in which sulphate is converted to barium sulphate suspension and the resultant turbidity was then measured using a spectrophotometer at 420 nm and compared with standard curved prepared from standard sulphates solution.

Nitrates

The concentration of nitrates was determined by spectrophotometric method [29, 30]. 50 cm³ of water sample was acidified with 1N HCl in a 100 cm³ volumetric flask and mixed thoroughly followed by the addition of 0.5 cm³ of brocine-sulfanilic acid and heating in a water bath for 25 minutes. After cooling, the absorbance was read at 410nm including the blank using the Shimadzu UV-visible spectrophotometer (UV-180 series). This procedure was repeated on the standard solutions for preparing standard calibrations.

Phosphates

Analysis of phosphate was done by the molybdenum blue method [31, 32]. 10 cm³ of each of the standards, blank and samples were measured into a test tube. 2 cm³ of combined reagent were added to the standards, blanks and samples. 1 drop of phenolphthalein indicator was added to the solutions upon which pink colour develops and 5N sulfuric acid was added drop wise to discharge the colour. Ten minutes was allowed to elapse, after which absorbance of each solution was measured at 880 nm on a UV-Vis spectrophotometer.

Chloride

Chloride in water was determined using the argentometric method involving titration of the sample against a silver nitrate indicator [33]. 25 cm³ water sample was transferred to 250 cm³ conical flask and 1 cm³ potassium dichromate solution was added. The solution was titrated from yellow to brick red using 0.001N silver nitrate. Chloride ion was calculated as follow:

$$\text{Cl}^- (\text{mg/L}) = \frac{A - B \times 0.001}{25} \times 1000 \quad (10)$$

Fluoride

A Shimadzu UV-visible spectrophotometer (UV-180 series)) was used to measure the absorbance of the sample. 1.0 ppm fluoride stock solution was prepared by dissolving 2.22 g of dried sodium fluoride in 1 L of deionized water. A range of calibration standards were prepared by serial dilution to determine fluoride levels. 0.12 g Eriochrome Black T was used to prepare 0.001 M dye solution. Fluoride concentration was then determined at wavelength of 535 nm and results were comparable to that obtained using HI83200 multiparameter with 2 mL of HI 93729-0 SPADNS reagent on the same water sample in the central laboratory.

Carbonate and bicarbonates

The levels of carbonate and bicarbonates in water were determined by the titrimetric method. Carbonates was determined titrimetrically by transferring 25 mL of the water into 250 mL conical flask, followed by addition of 2 drops of phenolphthalein and followed by addition of sample 0.1 M sulfuric acid using burette until the disappearance of pink colour which signalled end point for carbonate. Bicarbonates was determined by repeating the same titration steps except usage of methyl orange which change colour from yellow to pink at neutralization point. Amount of carbonate and bicarbonate in mg/L was determined.

Determination of metal ions

The method described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) was used for metal analysis [34]. The samples were digested by boiling with 10 mL of 20% hydrochloric acid in a beaker and then filtered into a 100 mL standard flask. This was made up to the mark with deionized water. The concentrations of Na, K, Ca, Mg, Fe, Pb, Cd, As, Cr, Cu, Co, Ni, Zn, Mn, and Hg were measured at 589, 766.5, 422.7, 285.2, 248.3, 217, 228.8, 193.7, 357.9, 324.8, 240.7, 232, 213.9, 279.5 and 253.7 nm respectively, using atomic absorption spectrophotometer (Agilent 280FS AA) with a hydride generator. Both calibration and rinse blanks were used to establish calibration curve and flush atomic absorption spectrophotometer between samples and standards respectively. The blanks were prepared under the same sample preparation procedure as the samples. The AAS instrument was set to automatically recalibrate after each five sets of samples analysed, while triplicate measurements were done and the mean value of each metal was recorded in order to enhance the reliability and reproducibility of measurements. All reagents used were of analytical grade. The atomic absorption spectrophotometer functioned under optimal conditions such as measurement mode (integrated), Slit with (0.5 nm), gain (57%), lamp current (10.0 mA), flame type (air/acetylene), air flow (13.5 L/min), acetylene flow (2.0 L/min), burner height (13.5mm), measurement time (10.0 seconds), while the detection limit was of 0.001 ppm.

Method validation for metal analysis

Samples were spiked with 0.5 mg/L of standard solutions of the respective metals before digestion in order to establish the accuracy of the analysis. Spiked samples were subsequently exposed to similar analytical conditions as the test sample. Percentage recovery was then calculated using the equation below:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Concentration of spike sample} - \text{Concentration of unspiked sample}}{\text{Actual spike concentration}} \quad (11)$$

Recovery percentages of results for Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , As^{3+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , and Hg^{2+} ranged from 91 – 102 %.

RESULTS AND DISCUSSION

The results for geochemical properties of both surface water and groundwater samples from Gosa Dumpsite and its environs are presented in Table 2. The pH of surface water (Table 2) ranged from 6.20 ± 0.10 to 7.10 ± 0.01 with a mean value of 6.77 ± 0.01 while the pH of groundwater (Table 2) ranged from 6.30 ± 0.12 to 8.20 ± 0.03 . The pH of both surface and groundwater samples was within the recommended standard limit (6.5-8.5) for drinking water [35]. The results were similar to that of Longe and Balogun who reported groundwater samples' pH, mostly within the acidic range, with a mean value of 6.62 which falls within the permissible WHO standard [36]. Also, pH values that ranged from 6.0 to 6.9 were reported by Saheed *et al.* [37] which correspond to values obtained in this study. As earlier observed by Daniel *et al.* [38], low pH values of natural water sources may be attributed to the first stage of leachate formation. The levels of TDS in surface water ranged from (110 ± 0.15 to 2000 ± 1.02) mg/L with a mean value of 939.29 ± 0.53 mg/L. Shallow well water samples, SW1, SW2 and SW3 recorded higher values of TDS above recommended standard limit of 1000 mg/L. Total dissolved solids in groundwater samples ranged from (196 ± 0.60 to 562 ± 0.12) mg/L with an average value of 321 ± 0.31 mg/L. TDS is a measure of the aggregate dissolved content of all organic and inorganic substances existing in a liquid. TDS level less than 600 mg/L is typically believed to be optimal for portable water but at TDS levels higher than 1000 mg/L water gradually becomes unpalatable. Water samples with lower or higher values of TDS may exhibit a characteristic insipid taste or objectionable mineral taste respectively. Excessive scaling in heaters, boilers and water pipes has been attributed to very higher levels of total dissolved solids in water. The electrical conductivity (EC) of surface water ranged from (0.15 ± 0.01 to 3.72 ± 0.01) $\mu\text{S}/\text{cm}$ with a mean value of 1.57 ± 0.02 $\mu\text{S}/\text{cm}$, while that of groundwater ranged from (0.27 ± 0.02 to 0.78 ± 0.06) $\mu\text{S}/\text{cm}$ with an average value of 0.45 ± 0.03 $\mu\text{S}/\text{cm}$. The mean electrical conductivity of surface water in this study was higher than that of groundwater but values were well below the standard recommended limit (1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$), indicating that the contaminating species do not adversely affect the electrical conductivity, maintaining it at permissible values [39]. Saheed *et al.* [37],

reported mean electrical conductivity ($409\ \mu\text{S}/\text{cm}$) which was higher than the range of values in the present study but was within WHO's Standard Maximum Permissible limits. Similarly, the mean electrical conductivity ($199.4\ \mu\text{S}/\text{cm}$) reported by Oyelami *et al.* [40] was higher than the result in the present study but falls within WHO/SON maximum permissible limits.

The amount of dissolved inorganic and organic substances as well as pH determine to a greater extent the electrical conductivity of water [41]. The temperature of surface water and groundwater ranged from (29.60 ± 0.12 to 32.30 ± 0.10) °C and from (31.10 ± 0.07 to 32.70 ± 0.02) °C, respectively, but it was within the ambient temperature. The level of turbidity (Turb) in surface water varies between samples while the minimum and maximum levels of turbidity were 12.0 ± 0.05 NTU and 175 ± 0.06 NTU respectively. In groundwater, turbidity ranged from (0.5 ± 0.01 to 1.0 ± 0.01) NTU with an average value of 0.67 ± 0.01 NTU in groundwater. The levels of turbidity in groundwater samples were lower compared to surface water samples, however, values of turbidity in surface water were higher than 5 NTU recommended by standard organizations [42]. Turbidity is the degree of cloudiness of water brought about by suspended particles such as clay, silts, chemical precipitation of manganese and iron, organic particles and organisms [42]. High levels of turbidity affect the clarity of water to transmit light and consequently reduce the acceptability of drinking water. The surface water samples are therefore polluted concerning turbidity.

The levels of dissolved oxygen (DO) and biochemical oxygen demand (BOD) in surface water ranged from (4.35 ± 0.04 to 5.55 ± 0.10) mg/L and from (2.95 ± 0.05 to 3.88 ± 0.10) mg/L, respectively. Dissolved oxygen in groundwater ranged from (5.54 ± 0.11 to 5.66 ± 0.06) mg/L with a mean value of 5.59 ± 0.09 mg/L, while from (2.85 ± 0.05 to 2.95 ± 0.05) mg/L was the range for levels of biochemical oxygen demand. DO level of 5.0 is recommended and suitable for the survival of aquatic life [35]. The DO level for SW1-SW3 and SDP2 in surface water and all the groundwater samples were slightly higher than the permissible limit but may not constitute any serious health hazard.

The metal concentrations in both surface water and groundwater are shown in Table 2. Sodium ion (Na^+) concentrations ranged from (9.45 ± 0.14 to 10.5 ± 0.10) mg/L with a mean value of 9.09 ± 0.08 mg/L in surface water whereas, in groundwater, sodium recorded a maximum concentration of 8.29 ± 0.05 mg/L (BH3) and a minimum level of 7.39 ± 0.03 mg/L (BH1). These results correspond to the mean concentration of 11.75 mg/L reported in groundwater within the vicinity of a dumpsite in Ibadan Nigeria [40]. The concentrations of sodium in surface water were generally higher than that of groundwater but lower than the provision guideline level (200 mg/L) recom-

mended by the World Health Organisation [42], indicating that the two categories of water samples were not polluted concerning sodium metal. Sodium is a beneficial element that enhances plant growth in a good number of ways but may not be very necessary for the accomplishment of the life cycle for such plants. The levels of potassium ion (K^+) in surface water ranged from $(0.05 \pm 0.00$ to $0.29 \pm 0.02)$ mg/L with an average value of 0.15 ± 0.01 mg/L. Sample BH3 had the least concentration of potassium (0.05 ± 0.01 mg/L) while BH1 recorded the highest concentration (0.15 ± 0.01 mg/L) in groundwater. Surface water had slightly higher levels of potassium compared to groundwater but the difference is not highly significant.

The concentrations of potassium in both groundwater and surface water were much lower but within the maximum recommended limits of 200 mg/L in drinking water. This result appeared to be lower than those reported which varied from 1.04 to 24.41 with an average value of 5.66 mg/L [40]. The slightly higher concentration of potassium was attributed to the underlying geology of the study area [40]. Potassium is an essential element that is absorbed by plants roots and is required for the accomplishment of plants' life cycle and growth. The concentrations of calcium ion (Ca^{2+}) in surface water ranged from 0.04 ± 0.01 - 0.67 ± 0.02 mg/L with an average value of 0.27 ± 0.02 mg/L while the levels of Ca^{2+} in groundwater ranged from $(0.02 \pm 0.01$ to $0.12 \pm 0.01)$ mg/L and a mean value of 0.06 ± 0.01 mg/L. The concentrations of Ca^{2+} were lower than the maximum recommended limits (75 mg/L) in drinking water, indicating that all the water samples were unpolluted concerning Ca^{2+} . The minimum and maximum concentrations of Mg^{2+} in surface water were 0.99 ± 0.12 mg/L (SW2) and 1.19 ± 0.02 mg/L (SDP1) respectively. Similarly, in groundwater the concentrations of Mg^{2+} ranged from $(0.98 \pm 0.04$ to $1.16 \pm 0.01)$ mg/L whereas BH1 and BH2 had the lowest and highest levels respectively.

The concentration Mg^{2+} was lower than 20 mg/L and 50 mg/L maximum permissible limits recommended by World Health Organisation and Nigeria's industrial water standard for drinking water respectively [42, 43]. These results for Ca^{2+} and Mg^{2+} correspond with those of Adeyemo *et al.* [44], with mean Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations of 23.42 mg/L and 4.39 mg/L respectively. The concentration of Fe ranged from $(0.82 \pm 0.07$ to $2.76 \pm 0.04)$ mg/L in surface water with an average value of 1.22 ± 0.06 mg/L, whereas a concentration range of $(0.77 \pm 0.03$ to $2.06 \pm 0.02)$ mg/L was recorded for Fe in groundwater. These values appeared to be higher than the provisional guideline value of 0.3 mg/L proposed by the World Health Organization [42] and the maximum permissible limit of 0.3 mg/L recommended by Nigeria's standard for drinking water quality [43]. This result corresponds to a range of 0.00 to 1.36 with an average of 0.23 mg/L reported for groundwater within the vicinity of the refuse dump in Ibadan Nigeria [40]. The concentrations of lead in surface water vary from minimum and maxi-

imum values of 0.29 ± 0.05 mg/L to 0.41 ± 0.01 mg/L with an average value (0.33 ± 0.03 mg/L) respectively. However, for groundwater samples, the concentrations of Pb ranged from (0.49 ± 0.05 to 0.56 ± 0.02) mg/L with a mean value of 0.51 ± 0.05 mg/L.

Interestingly, the concentrations of Pb in all the samples evaluated in this study were higher than WHO maximum permissible limits. This is a strong indication that both surface water and groundwater samples were polluted concerning lead and may not be safe for drinking. The enrichment of lead is similar to the results of Adelekan and Abegunde [45] and Saheed *et al.* [37]. The high lead concentrations may be associated with the combustion of fossil fuel, dumping of metal products rich in lead, cosmetics and waste batteries which has leached into the soil. Cadmium concentrations in surface water vary from one sample to the other but ranged from (0.06 ± 0.01 to 0.22 ± 0.05) mg/L with an average value of 0.10 ± 0.03 mg/L. Similarly, the cadmium concentrations in groundwater samples ranged from (0.11 ± 0.01 to 0.20 ± 0.02) mg/L with an average value of 0.16 ± 0.02 mg/L. These values were higher than WHO guideline values of 0.003 mg/L for drinking water, indicating a higher level of pollution of the groundwater and surface water in the study area [46]. The high concentration of Cd^{2+} is similar to the results of Saheed *et al.* [37]. Which may be attributed to leachate from agricultural farmland within the vicinity of the dumpsite where phosphate fertilizer may have been used.

The bioavailability or adsorption of cadmium compounds depends largely on the solubility of the compounds. Cadmium bioaccumulates in the kidney which is its primary target organ for toxicity and is classified as probably carcinogenic to humans (Group 2A) by International Agency for Research on Cancer (IARC) [47]. The concentration of arsenic (As^{3+}) in surface water samples was below the detection limit while that of groundwater ranged from 0.03 ± 0.01 – 0.13 ± 0.03 mg/L with an average value of 0.06 ± 0.02 mg/L. The provisional guideline value for arsenic in drinking water is 0.01 mg/L [42, 43], but the values for the concentrations of As^{3+} in groundwater were higher than the provisional value. The groundwater mainly from boreholes in communities within the vicinity of the Gosa dumpsites was polluted concerning arsenic.

Arsenic is one of the toxic substances or elements thought to be responsible for widespread health effects as a result of drinking water exposure. The ingesting of higher concentrations of arsenic through drinking water will result in the growth of cancer in the body. Other toxicity of arsenic exposure through drinking water includes hyperpigmentation and hypopigmentation, exterior neuropathy, cancer of the skin, bladder and lung cancers and peripheral vascular disease [42]. The concentrations of chromium (Cr^{3+}) in surface water samples ranged from (0.04 ± 0.01 to 0.10 ± 0.02) mg/L with a mean value of 0.08 ± 0.01 mg/L. Besides, (0.03 ± 0.01 to 0.12 ± 0.01) mg/L was the range

of concentrations of Cr^{3+} in groundwater samples but the levels of chromium in water samples were higher than the standard provisional guideline value of 0.05 mg/L [42]. This result corresponds to the mean chromium concentration (0.098 ± 0.002 mg/L) reported by Ibironke *et al.* [48] on surface water due to Leachate from the municipal dumpsite. Chromium occurs in valences that ranged from +2 to +6 in its compounds but most stable at Cr^{3+} . A strong association has been established between exposure to the hexavalent form of chromium through the inhalation pathway and lung cancer. Hexa-valence form of chromium (Cr^{6+}) is a Group 1 human carcinogen according to International Agency for Research on Cancer (IARC) [47].

The concentrations of copper ions (Cu^{2+}) in surface water samples ranged between (0.07 ± 0.01 and 0.16 ± 0.05) mg/L with a mean value of 0.11 ± 0.02 mg/L. The range of copper concentrations (0.21 ± 0.02 to 0.27 ± 0.03 mg/L) in groundwater was higher than those of surface water. Copper (Cu^{2+}) concentrations in this study were lower than the recommended standard guideline value of 2 mg/L [42]. Copper is a contaminant of water and also an essential nutrient for plant growth. Wilson disease, metabolic disorders, and gastrointestinal disorders are the most likely toxicity of copper. The minimum concentrations of cobalt recorded in surface water and groundwater were 0.18 ± 0.02 mg/L and 0.30 ± 0.01 mg/L respectively. On the other hand, the maximum concentrations of cobalt (Co^{2+}) in surface water and groundwater samples were 0.44 ± 0.12 mg/L and 0.40 ± 0.02 mg/L respectively.

The nickel ion (Ni^{2+}) concentrations ranged from (0.10 ± 0.01 to 0.25 ± 0.03) mg/L with an average value of 0.16 ± 0.02 mg/L in surface water. The minimum and maximum concentrations of Ni^{2+} in groundwater were 0.03 ± 0.01 mg/L and 0.08 ± 0.02 mg/L respectively. The levels of Ni were higher in surface water samples than in groundwater samples. The guideline value of Ni in drinking water is 0.07 mg/L [42]. The levels of Ni in surface water samples exceeded the recommended guideline value, indicating that all the surface water samples were polluted concerning nickel. The high concentration of Ni is above WHO/SON permissible limits was reported in soil and groundwater around a refuse dump in Ibadan, Nigeria [37]. Nickel is an essential nutrient for plant growth. The most common toxicity of nickel is allergic contact dermatitis. Inhaled nickel compounds and nickel metal are carcinogenic to humans and have been classified by the IARC as Group 1 and Group 2 carcinogenic, but there is the dearth of evidence on possible carcinogenic health risks through oral exposure to nickel [47].

The minimum concentrations of zinc ions (Zn^{2+}) in surface water and groundwater were 0.11 ± 0.05 mg/L and 0.17 ± 0.02 mg/L respectively. Conversely, the maximum concentrations of Zn^{2+} in surface water and groundwater samples were 0.43 ± 0.01 mg/L and 0.20 ± 0.01 mg/L respectively. The levels at which Zn is found in water are

not of health concern hence there is no guideline value recommended by the world health organization. Nevertheless, a concentration of zinc higher than 3.0 mg/L is not suitable and acceptable for drinking water [49]. Zinc is an essential element required by both plants and humans for healthy growth. The concentrations of manganese (Mn^{2+}) in surface water samples ranged from (1.55 ± 0.20) to (2.32 ± 0.05) mg/L with a mean value of 1.86 ± 0.21 mg/L. In groundwater, the levels of Mn^{2+} ranged from (1.72 ± 0.01) to (2.01 ± 0.31) mg/L. Manganese concentrations higher than 0.1 mg/L in water supplies are linked to objectionable taste in beverages and staining of wares and laundry, coating on pipes and black precipitate results at manganese levels of 0.2 mg/L. However, the health base value of 0.5 mg/L has been proposed for manganese [35]. The concentrations of manganese in this study exceeded the recommended health base value and may adversely impact human health, especially children, hence the water samples were polluted with respect to manganese. Daniel *et al.* [38] observed the enrichment of Mn in natural water sources above the drinking water standard limits and attributed possible sources of Mn^{2+} to agricultural activities (extensive use of fungicides and fertilizers) and automobile parts as well as tools from the dump site. Manganese is an essential trace element required for the healthy growth of plants, humans and other animals. Manganese has been linked to adverse effects on learning in children [35].

The levels of mercury in both surface water and groundwater samples are below the detection limits of the atomic absorption spectrophotometer and hence is not of any health concern. The guideline value for mercury in drinking water is 0.006 mg/L [42]. The study area is not polluted concerning mercury. The concentrations of anions in both surface and groundwater are also presented in Table 2. The sulphates (SO_4^{2-}) concentrations in both surface water and groundwater samples ranged from (4.96 ± 0.32) to (24.32 ± 0.02) mg/L and from (5.80 ± 0.22) to (6.16 ± 0.02) mg/L, respectively. The average concentration of SO_4^{2-} in surface water (9.37 ± 0.23 mg/L) seems to be higher than that of groundwater samples (6.27 ± 0.15 mg/L). Nevertheless, sulphate concentration between (250 and 300) mg/L is very suitable for the support of fisheries and aquatic life. The sulphate concentrations for all the borehole water in this study were within the acceptable maximum permissible limits (500 mg/L) recommended [42], indicating that the groundwater samples were not polluted with respect to sulphate ions. The sulphate concentrations were within the range previously reported on groundwater in the vicinity of dumpsites at Aduramigba Estate within Osogbo Metropolis [40], and Lagos in Southwestern Nigeria [50].

Phosphates (PO_4^{3-}) had minimum and maximum concentrations of 0.40 ± 0.02 mg/L and 0.92 ± 0.02 mg/L in surface water respectively. The phosphate ion concentration in groundwater ranged from (0.01 ± 0.00) to (0.79 ± 0.02) mg/L with an average value of 0.29 ± 0.01 mg/L. The concentration of phosphate ions appeared to be greater in

surface water than in groundwater. Nonetheless, the phosphate ions concentrations in both groundwater and surface water were below the maximum permissible limit of 5.0 mg/L, indicating that groundwater is not polluted with respect to phosphate ions.

The nitrate (NO_3^-) concentrations ranged from (0.35 ± 0.21) to (16.47 ± 0.11) mg/L with a mean concentration of 7.97 ± 0.12 mg/L. The nitrate (NO_3^-) concentrations in groundwater ranged from (8.93 ± 0.12) to (11.81 ± 0.22) mg/L with a mean value of 10.58 ± 0.22 mg/L. The results of nitrate concentrations in most of the boreholes (BH2, BH3) appeared to be lower than the standard maximum limits of 50.0 mg/L for drinking water [49, 51]. The nitrate enrichment of groundwater in the present study corresponds to the range (0.1 to 10) mg/L, reported by Adeyemo *et al.* [44].

Chloride ion (Cl^-) had a concentration in surface water that ranged from (5.0 ± 0.01) to (280 ± 0.62) mg/L with a mean of 127.86 ± 0.47 mg/L. The results of chloride ions concentrations were within the standard maximum permissible limits of 250 mg/L in most of the surface water samples except for SW1 (280 mg/L) and SW3 (240 mg/L). Chloride had concentrations in groundwater that ranged from (15.0 ± 0.30) to (230 ± 0.20) mg/L with a mean value of 96.7 ± 0.20 mg/L. Chloride ions comparatively had lower concentrations in groundwater than in surface water but appeared to be within the standard recommended limits of 250 mg/L in all the groundwater samples. The mean chloride concentration of 268.87 mg/L was reported on groundwater in the vicinity of dumpsites at Aduramigba Estate within Osogbo Metropolis [40], higher than the ones in the present study but above the recommended standards for drinking water. Higher concentrations of chloride could enhance the corrosion rate in water distribution systems [51]. Fluoride ions (F^-) concentrations in surface water were below the detection limit of the AAS instrument while fluoride ions (F^-) concentrations for groundwater were below the detection limit in most of the samples (BH1, BH2), except BH3 (0.01 ± 0.00 mg/L).

The maximum standard permissible limit of fluoride in drinking water is 1.5 mg/L and the concentration levels of fluoride ions were within the acceptable recommended limit. The carbonate (CO_3^{2-}) and hydrogen bicarbonate ions (HCO_3^-) concentrations in surface water ranged from (52.0 ± 0.12) to (188.0 ± 0.30) mg/L and from (15.20 ± 0.55) to (43.70 ± 0.50) mg/L in both surface water and groundwater respectively. The CO_3^{2-} and HCO_3^- ions in groundwater had concentration levels that ranged from (116.0 ± 0.19) to (140.0 ± 0.08) mg/L and from (26.60 ± 0.22) to (45.60 ± 0.70) mg/L respectively. The levels of bicarbonate were comparable to the range of values previously reported [40].

The computed metal index for surface and groundwater are presented in Table 3 and 4 respectively.

Table 2. Geochemistry of surface water and groundwater within the vicinity of Gosa dumpsite (mean $\pm$ SD)

Parameter	Surface water							Ground water				Standards	
	SW 1	SW/2	SW/3	SDP1	SDP2	JL1	JL2	BH1	BH2	BH3	mean	WHO	SON/ NIN
pH	7.10 ±0.01	6.90 ±0.20	7.30 ±0.12	6.20 ±0.10	6.50 ±0.12	6.70 ±0.02	6.70 ±0.10	6.30 ±0.12	7.40 ±0.01	8.20 ±0.03	6.93 ±0.07	6.5-8.5	6.5-8.5
TDS (mg/L)	2000 ±1.02	2000 ±0.91	2000 ±0.53	110 ±0.15	231 ±0.10	117 ±0.11	117 ±0.92	562 ±0.12	196 ±0.60	205 ±0.22	753.8 ±0.47	1000	500
EC (µS/ cm)	2.96 ±0.02	3.72 ±0.01	3.54 ±0.05	0.15 ±0.01	0.32 ±0.03	0.16 ±0.01	0.16 ±0.01	0.78 ±0.06	0.27 ±0.02	0.29 ±0.01	1.24 ±0.02	1000	1000
Temp (°C)	31.40 ±0.10	30.60 ±0.20	29.60 ±0.12	30.50 ±0.10	30.90 ±0.05	32.30 ±0.08	32.30 ±0.10	31.10 ±0.07	32.30 ±0.20	32.70 ±0.02	31.37 ±0.14	25-30	-
Turb (mg/L)	12.00 ±0.10	61.00 ±0.18	65.00 ±0.50	164.00 ±1.01	175.00 ±0.06	12.00 ±0.05	13.00 ±0.01	0.50 ±0.02	0.50 ±0.01	1.00 ±0.01	50.4 ±0.20	5.0	-
DO (mg/L)	5.55 ±0.10	5.27 ±0.08	5.19 ±0.05	4.98 ±0.03	5.10 ±0.08	4.35 ±0.04	4.38 ±0.01	5.56 ±0.11	5.66 ±0.06	5.54 ±0.11	5.16 ±0.07	5.0	-
BOD (mg/L)	3.45 ±0.01	3.30 ±0.10	3.25 ±0.12	2.95 ±0.05	3.00 ±0.04	3.85 ±0.02	3.88 ±0.10	2.85 ±0.09	2.85 ±0.05	2.95 ±0.05	3.23 ±0.06	-	-
Na ⁺ (mg/L)	7.84 ±0.10	9.45 ±0.14	9.02 ±0.11	10.50 ±0.10	8.85 ±0.08	8.18 ±0.02	9.79 ±0.04	7.39 ±0.03	8.25 ±0.11	8.29 ±0.05	8.76 ±0.08	200	200
K ⁺ (mg/L)	0.13 ±0.01	0.16 ±0.01	0.16 ±0.01	0.29 ±0.02	0.16 ±0.01	0.05 ±0.00	0.10 ±0.02	0.15 ±0.01	0.14 ±0.03	0.05 ±0.01	0.14 ±0.01	200	-
Ca ²⁺ (mg/L)	0.04 ±0.01	0.37 ±0.03	0.61 ±0.02	0.67 ±0.02	0.07 ±0.01	0.05 ±0.01	0.08 ±0.01	0.12 ±0.01	0.05 ±0.01	0.02 ±0.01	0.21 ±0.02	75	-
Mg ²⁺ (mg/L)	1.04 ±0.10	0.99 ±0.12	1.01 ±0.05	1.19 ±0.02	1.15 ±0.07	1.14 ±0.05	1.16 ±0.10	0.98 ±0.04	1.16 ±0.01	1.12 ±0.01	1.09 ±0.06	50	20
Fe ²⁺ (mg/L)	0.82 ±0.07	1.15 ±0.05	1.28 ±0.11	2.76 ±0.04	0.92 ±0.10	0.88 ±0.01	0.76 ±0.03	2.06 ±0.02	0.94 ±0.02	0.77 ±0.03	1.23 ±0.05	0.3	0.3

(Continued)

Parameter	Surface water						Ground water			Standards			
	SW1	SW2	SW3	SDP1	SDP2	JL1	JL2	BH1	BH2	BH3	mean	WHO	SON/ NIN
Pb ²⁺ (mg/L)	0.30 ±0.01	0.29 ±0.05	0.35 ±0.04	0.37 ±0.01	0.32 ±0.03	0.41 ±0.01	0.30 ±0.05	0.49 ±0.05	0.56 ±0.02	0.49 ±0.10	0.39 ±0.04	0.01	0.01
Cd ²⁺ (mg/L)	0.07 ±0.03	0.06 ±0.01	0.08 ±0.02	0.10 ±0.01	0.22 ±0.05	0.12 ±0.03	0.05 ±0.04	0.11 ±0.01	0.18 ±0.02	0.20 ±0.02	0.12 ±0.02	0.003	0.003
As ³⁺ (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.03 ±0.01	0.13 ±0.03	0.03 ±0.01	0.06 ±0.01	0.01	0.01
Cr ³⁺ (mg/L)	0.09 ±0.01	0.10 ±0.01	0.09 ±0.02	0.04 ±0.01	0.06 ±0.01	0.05 ±0.01	0.10 ±0.02	0.03 ±0.01	0.12 ±0.01	0.09 ±0.02	0.08 ±0.01	0.05	0.05
Cu ²⁺ (mg/L)	0.07 ±0.01	0.07 ±0.01	0.12 ±0.02	0.10 ±0.01	0.13 ±0.01	0.16 ±0.05	0.12 ±0.02	0.27 ±0.03	0.21 ±0.02	0.24 ±0.01	0.15 ±0.02	2.0	1.0
Co ²⁺ (mg/L)	0.20 ±0.01	0.21 ±0.03	0.18 ±0.02	0.44 ±0.12	0.41 ±0.05	0.31 ±0.01	0.26 ±0.01	0.40 ±0.02	0.32 ±0.03	0.30 ±0.01	0.31 ±0.03	-	-
Ni ²⁺ (mg/L)	0.22 ±0.01	0.25 ±0.03	0.19 ±0.04	0.12 ±0.02	0.14 ±0.01	0.10 ±0.01	0.11 ±0.01	0.08 ±0.02	0.03 ±0.01	0.05 ±0.02	0.13 ±0.02	0.07- 1.0	0.02
Zn ²⁺ (mg/L)	0.16 ±0.05	0.20 ±0.02	0.18 ±0.02	0.43 ±0.01	0.39 ±0.06	0.26 ±0.08	0.11 ±0.05	0.17 ±0.02	0.20 ±0.01	0.19 ±0.05	0.23 ±0.04	3.0	3.0
Mn ²⁺ (mg/L)	1.66 ±0.10	2.11 ±0.12	1.84 ±0.90	2.32 ±0.05	1.66 ±0.02	1.55 ±0.20	1.86 ±0.05	2.01 ±0.02	1.72 ±0.01	2.01 ±0.31	1.87 ±0.18	0.5	0.2
Hg ²⁺ (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	0.001
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	6.56 ±0.11	7.00 ±0.80	7.48 ±0.05	24.32 ±0.02	7.56 ±0.40	7.68 ±0.62	4.96 ±0.32	5.80 ±0.22	6.84 ±0.21	6.16 ±0.02	8.64 ±0.28	500	100
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0.92 ±0.02	0.75 ±0.10	0.40 ±0.20	2.57 ±0.05	0.45 ±0.01	0.47 ±0.03	0.40 ±0.02	0.79 ±0.02	0.01 ±0.00	0.07 ±0.01	0.68 ±0.05	5.0	-
NO ₃ ⁻ (mg/L)	2.28 ±0.02	8.13 ±0.10	5.65 ±0.01	0.35 ±0.21	7.14 ±0.34	14.48 ±0.05	16.47 ±0.11	8.93 ±0.12	11.01 ±0.32	11.81 ±0.22	8.63 ±0.15	50.0	50

Continued

(Continued)

Parameter	Surface water							Ground water				Standards	
	SW1	SW2	SW3	SDP1	SDP2	JL1	JL2	BH1	BH2	BH3	mean	WHO	SON/ NIN
Cl ⁻ (mg/L)	280.0 ±0.62	240.0 ±1.32	260.0 ±0.83	30.00 ±0.02	65.00 ±0.42	15.00 ±0.21	5.00 ±0.01	230 ±0.20	15.00 ±0.30	45.00 ±0.10	118.5 ±0.40	250	250
F (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01 ±0.00	-	1.5	1.5
CO ₃ ²⁻ (mg/L)	176.0 ±0.42	188.0 ±0.30	176.0 ±1.12	52.00 ±0.12	124.0 ±0.91	68.00 ±0.40	60.00 ±0.51	140 ±0.08	116.0 ±0.19	116.00 ±0.92	121.6 ±0.48	-	-
HCO ₃ ⁻ (mg/L)	32.30 ±0.12	38.00 ±0.82	34.20 ±0.10	43.70 ±0.50	19.00 ±0.90	15.20 ±0.55	19.00 ±0.05	45.60 ±0.70	32.30 ±0.12	26.60 ±0.22	30.59 ±0.41	-	-

ND: Not detected

Table 3. Metal index for cations and heavy metals in surface water

Merals	SW1	SW2	SW3	SDP1	SDP2	JL1	JL2	Mean
Na	0.0392	0.0473	0.0451	0.0525	0.0443	0.0409	0.0490	0.0455
K	0.0007	0.0008	0.0008	0.0015	0.0008	0.0003	0.0005	0.0008
Ca	0.0005	0.0049	0.0081	0.0089	0.0009	0.0007	0.0011	0.0036
Mg	0.0208	0.0198	0.0202	0.0238	0.023	0.0228	0.0232	0.022
Fe	2.733	3.833	4.266	9.222	3.066	2.933	2.533	4.066
Pb	30.00	29.00	35.00	37.00	32.00	41.00	30.00	33.00
Cd	23.33	26.66	26.66	33.33	73.33	40.00	16.66	33.33
Cr	1.800	2.00	1.80	0.80	1.20	1.00	2.00	1.60
Cu	0.035	0.035	0.06	0.05	0.065	0.08	0.06	0.055
Ni	3.143	3.571	2.714	1.714	2.000	1.428	1.571	2.285
Zn	0.053	0.066	0.06	0.143	0.13	0.086	0.037	0.083
Mn	3.32	4.22	3.68	4.64	3.32	3.10	3.72	3.72

Table 4. Metal index for cations and heavy metals in ground water

Metals	BH1	BH2	BH3	mean
Na	0.0370	0.0413	0.0415	0.0399
K	0.0008	0.0007	0.0003	0.0006
Ca	0.0016	0.0007	0.0003	0.0008
Mg	0.0196	0.0232	0.0224	0.0218
Fe	6.8667	3.123	2.567	4.200
Pb	49.00	56.00	49.00	51.00
Cd	36.67	60.00	66.67	53.33
As	3.33	43.33	10.00	20.00
Cr	0.60	2.40	1.80	1.60
Cu	0.135	0.105	0.12	0.12
Ni	1.142	0.429	0.714	0.714
Zn	0.057	0.067	0.063	0.063
Mn	4.02	3.44	4.02	3.82

A metal index greater than one indicates pollution of the water sample has occurred while a metal index less than one implies no pollution. In surface water, the mean metal index for Na, K, Ca, Mg, Cu and Zn were 0.0455, 0.0008, 0.0036, 0.022, 0.055 and 0.083 respectively. These values of the metal index for Na, K, Ca, Mg, Cu and Zn were less than 1, reinforcing the fact that surface water was not polluted with respect to these metals. Similarly, the average metal index for Fe, Pb, Cd, Cr, Ni, and Mn in freshwater samples were 4.066, 33.00, 33.33, 1.60, 2.285 and 3.72 respectively. Conversely, Fe, Pb, Cd, Cr, Ni, and Mn had metal indices greater than 1, hence surface water samples were polluted with respect to each of these metals. The mean metal index for Na, K, Ca, Mg, Cu, Ni and Zn in groundwater were 0.0399, 0.0006, 0.0008, 0.0218, 0.12, 0.714 and 0.063 respectively. Nevertheless, Fe, Pb, Cd, As, Cr and Mn had computed metal indices of 4.20, 51.00, 53.33, 20.00, 1.60 and 3.82, respectively, which are greater than the threshold value of 1.0 indicating pollution of groundwater with respect to these heavy metals. The computed Water Quality Index (WQI) for metals in both surface and groundwater is shown in Fig. 2 below. BH2 had the highest value (13501.85) of WQI whereas SW1 had the lowest value (6447.52). The WQI in all the water samples and sampling sites were greater than 100, which is a strong indication that water from these sources wears unsuitable and unsafe for drinking purposes.

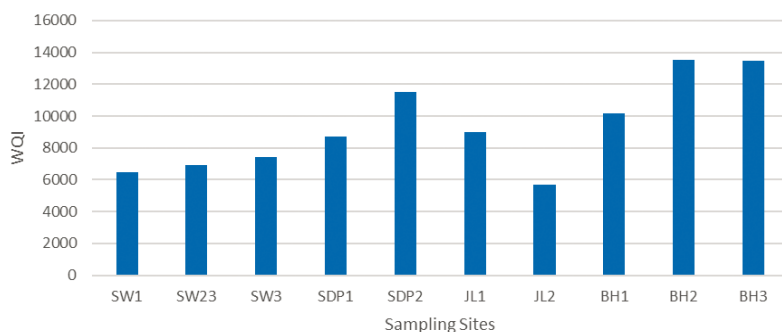


Figure 2. WQI of Cations in both surface and groundwater samples

The quantity, exposure duration and toxicity of heavy metals in addition to other chemical substances determine the human health risks [52].

The estimated daily intake of water by an adult was calculated and presented in Table 5. The mean estimated daily intake for Fe, Pb, Cd, As, Cr, Cu, Co, Ni, Zn and Mn were 0.0039, 0.0123, 0.00378, 0.00061, 0.00249, 0.00470, 0.00961, 0.00409, 0.00727 and 0.05950, respectively.

The calculated hazard quotients of heavy metals are presented in Table 6. RfD values for Cd (0.001), Cr (0.003), As (0.0003), Ni (0.02), Hg (0.0001), Pb (0.004), Cu (0.04), Zn (0.3), Mn (0.14), Fe (0.70) and Co (0.02) were used for computing the hazard quotients [46]. The non-carcinogenic health risks for each heavy metal in both surface and groundwater samples were assessed by calculating the hazard quotient. Table 6 revealed that the mean hazard quotient (HQ) for Fe, Pb, Cd, As, Cr, Cu, Co, Ni, Zn and Mn were 0.056, 3.078, 3.780, 6.778, 0.830, 0.118, 0.481, 0.205, 0.024 and 0.425, respectively. The mean hazard quotient (HQ) values were less than one (1.0) for Fe, Cr, Cu, Co, Ni, Zn and Mn while Pb, Cd and As had HQ values that exceeded the threshold hazard quotient (HQ) values of one (1.0), suggesting the possibility of potential health risk associated with Pb, Cd and As through consumption of drinking water. Table 6 also revealed that hazard index (HI) values ranged from 6.195 - 31.593 with JL2 and BH2 having the minimum and maximum HI, respectively. The HI values in this study exceeded the acceptable value of one, indicating the associated chronic health risk effects of these heavy metals combined. Nickel, cadmium, chromium, arsenic and lead were designated as group 1 and 2 potential carcinogenicity metals respectively by the International Agency for Research on Cancer (IARC) but Zn, Al, Mn and Cu were classified as non-carcinogenic metals [53]. Cancer slope factor for Pb, Ni and Cd are 0.009, 1.7 and 0.6, respectively [54, 55], while that of As and Cr are 1.5 and 0.501 correspondingly [47, 53]. The calculated values of incremental life cancer risk for the adult population are shown in Table 7.

Incremental life cancer risks for Pb, Cd, As, Cr and Ni ranged from 8.28×10^{-5} to 1.05×10^{-4} , 9.6×10^{-4} to 4.2×10^{-3} , 1.5×10^{-3} to 6.15×10^{-3} , 2.51×10^{-4} to 1.90×10^{-3} and 1.7×10^{-3} to 1.34×10^{-2} , respectively. The Incremental lifetime cancer risk (ILCR) values for lead were within the acceptable safe limit of 1.0×10^{-4} to 1.0×10^{-6} , and has the least chance of cancer risks. However, Cd, As, Cr and Ni had cancer risk values higher than the acceptable limits and have a very high chance of cancer risks through ingestion of water.

CONCLUSION

Most of the physicochemical parameters evaluated in the present study were within the acceptable limits while the mean concentrations of Fe, Pb, Cd, As, Cr and Mn exceeded the maximum permissible limits. Metal index and weighted water quality index for Fe, Pb, Cd, Cr, Ni, and Mn in all the stations were higher than the threshold values, indicating that the water samples were contaminated and unsafe for drinking purposes. The range of cancer risk values for lead (8.28×10^{-5} to 1.602×10^{-4}) was within the safe limit and may not poses potential cancer risks. Incremental lifetime cancer risks for Cd, As, Cr and Ni were higher than the safe limits ($< 1 \times 10^{-4}$), suggesting a high probability of potential cancer risk associated with consumption of these carcinogenic metals by the adult population who depending on these sources of water for livelihood.

Table 5. The estimated daily intake (mg/kg/day) EDI.

Metal (mg/L)	Surface water						Groundwater			
	SW1	SW2	SW3	SDP1	SDP2	SDP3	JL1	JL2	BH1	mean
Fe	0.0260	0.0365	0.0406	0.0876	0.0292	0.0279	0.0279	0.0241	0.0654	0.0039
Pb	0.0095	0.0092	0.0111	0.0117	0.0102	0.0130	0.0130	0.0095	0.0156	0.0123
Cd	0.0022	0.0019	0.0025	0.0032	0.0070	0.0038	0.0038	0.0016	0.0035	0.00378
As	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0010	0.00061
Cr	0.0029	0.0032	0.0029	0.0013	0.0019	0.0016	0.0016	0.0032	0.0010	0.00249
Cu	0.0022	0.0022	0.0038	0.0032	0.0041	0.0051	0.0051	0.0038	0.0086	0.00470
Co	0.0064	0.0067	0.0057	0.0140	0.0130	0.0098	0.0098	0.0083	0.0127	0.00961
Ni	0.0070	0.0079	0.0060	0.0038	0.0044	0.0032	0.0032	0.0035	0.0025	0.00409
Zn	0.0051	0.0064	0.0057	0.0137	0.0124	0.0083	0.0083	0.0035	0.0054	0.00727
Mn	0.0527	0.0670	0.0584	0.0737	0.0527	0.0492	0.0492	0.0591	0.0638	0.05950

Table 6. Hazard Quotient (HQ) for heavy metals in adult population

Metal (mg/L)	Surface water						Groundwater			
	SW1	SW2	SW3	SDP1	SDP2	SDP3	JL1	JL2	BH1	Mean HQ
Fe	0.037	0.052	0.058	0.125	0.042	0.040	0.040	0.034	0.093	0.056
Pb	2.375	2.300	2.775	2.925	2.550	3.250	3.250	2.375	3.900	3.078
Cd	2.20	1.90	2.50	3.20	7.00	3.800	3.800	1.600	3.500	3.780
As	-	-	-	-	-	-	-	-	11.67	6.778
Cr	0.967	1.066	0.967	0.433	0.633	0.533	0.533	1.067	0.333	0.830
Cu	0.056	0.055	0.095	0.08	0.103	0.128	0.128	0.095	0.215	0.118
Co	0.320	0.335	0.285	0.70	0.650	0.49	0.49	0.415	0.635	0.481
Ni	0.350	0.395	0.300	0.190	0.220	0.16	0.16	0.175	0.125	0.205

(Continued)

Metal (mg/L)	Surface water					Groundwater				Mean HQ	
	SW1	SW2	SW3	SDP1	SDP2	JL1	JL2	BH1	BH2		BH3
Zn	0.017	0.021	0.019	0.046	0.041	0.028	0.012	0.018	0.021	0.020	0.024
Mn	0.376	0.479	0.417	0.526	0.376	0.351	0.422	0.456	0.390	0.456	0.425
HI=ΣHQ	6.698	6.604	7.416	8.226	11.62	8.780	6.195	20.94	31.59	15.86	--

Table 7. Incremental lifetime cancer risk (ILCR) of carcinogenic human health risks through ingestion of water from the study area

Metal (mg/L)	Surface water					Groundwater				
	SW1	SW2	SW3	SDP1	SDP2	JL1	JL2	BH1	BH2	BH3
Pb	8.55×10^{-5}	8.28×10^{-5}	9.99×10^{-5}	1.05×10^{-4}	9.18×10^{-5}	1.17×10^{-4}	8.55×10^{-5}	1.40×10^{-4}	1.602×10^{-4}	1.40×10^{-4}
Cd	1.32×10^{-3}	1.14×10^{-3}	1.5×10^{-3}	1.92×10^{-3}	4.2×10^{-3}	2.28×10^{-3}	9.6×10^{-4}	2.1×10^{-3}	3.42×10^{-3}	2.05×10^{-3}
As	-	-	-	-	-	-	-	1.5×10^{-3}	6.15×10^{-3}	1.5×10^{-3}
Cr	1.45×10^{-3}	1.60×10^{-3}	1.45×10^{-3}	6.51×10^{-4}	9.52×10^{-4}	8.02×10^{-4}	1.60×10^{-3}	2.51×10^{-3}	1.90×10^{-3}	1.46×10^{-3}
Ni	1.19×10^{-2}	1.34×10^{-2}	1.02×10^{-2}	6.46×10^{-3}	7.48×10^{-3}	9.25×10^{-3}	5.95×10^{-3}	4.25×10^{-3}	1.7×10^{-3}	2.72×10^{-3}

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledged the management of National Open University of Nigeria for the approval of a Senate Research Grant that supported this research, and Abuja Environmental Protection Board for valuable access to dumpsite.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest and have no any relevant financial or non-financial interests to disclose.

Ethics approval: Not applicable.

Author Contributions: All authors contributed to the development, analysis, and drafting of this article

REFERENCES

1. H.O. Sawyerr, A.T. Adeolu, A.S. Afolabi, O.O. Salami, B.K. Badmos, Impact of dumpsites on the quality of soil and groundwater in satellite towns of the Federal Capital Territory, Abuja Nigeria, *Journal Health and Pollution*, **7**(14), 15-22 (2017). Doi: <https://doi.org/10.5696/2156-9614-7.14.15>
2. R. Bharose, B. Lal, Sudhir K Singh, P.K. Srivastava, Heavy metals pollution in soil-water-vegetation continuum irrigated with groundwater and untreated sewage, *Bulletin of Environmental and Scientific Research*, **2**(1), 1-8 (2013). URL: <http://www.besr.org.in/index.php/besr/article/view/35>
3. K.S. Rawat, S.K. Singh, Water quality indices and GIS-based evaluation of decadal groundwater quality, *Geology, Ecology, and Landscapes*, **2**(4), 240-255 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1080/24749508.2018.1452462>
4. R.A. Wuana, F.E. Okieimen, Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation, *International Scholarly Research Network, ISRN Ecology*, **2011**, ID 402647 (2011). Doi: <https://doi.org/10.5402/2011/402647>

5. K.A. Ayuba, L. Abd-Manaf, A.H. Sabrina, S.W.N. Azmin, A review on municipal solid waste Management in Nigeria, *Journal of American Science*, **8**(12), 975-982 (2012). URL: https://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0812/134_13610am0812_975_982.pdf
6. National Bureau of Statistics (NBS), *Demographic Statistics Bulletin*, 2020. URL: <https://nigerianstat.gov.ng/download/1241121>
7. National Population Commission (NPC), *Official release on 2019 population*, 2020. URL: <https://nationalpopulation.gov.ng/publications>
8. E.C. Ogoko, D. Emeziem, C.I. Osu, Water quality characteristics of floodwater from Aba metropolis, Nigeria, *American Chemical Science Journal*, **5**(2), 174-184 (2015). Doi: <https://doi.org/10.9734/ACSJ/2015/12649>
9. Z.J. Nasir, S.S.D. Mohammed, G. Mangse, Some physical properties and bacteriological evaluation of raw landfill leachate from Gosa Landfill in the Federal Capital Territory, Abuja, Nigeria, *Journal of Applied Science and Environmental Management*, **27**(2), 381-387 (2023). Doi: <https://doi.org/10.4314/jasem.v27i2.29>
10. A.K. Verma, D.N. Saksena, Assessment of water quality and pollution status of Kalpi (Morar) River, Gwalior, Madhya Pradesh: with special reference to conservation and management plan, *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, **1**(2), 419-429 (2010).
11. M.B. Ogundiran, O. Osibanjo, Heavy metal concentrations in soils and accumulation in plants growing in a deserted slag dumpsite in Nigeria, *African Journal of Biotechnology*, **7**(17), 3053-3060 (2008). Doi: <https://doi.org/10.5897/AJB08.322>
12. E.C. Ogoko, H.I. Kelle, Pollution status of solid waste disposal site in Owerri municipal, *International Journal of Basic Science and Technology*, **6**(1), 50-57 (2020).
13. E.C. Ogoko, H.I. Kelle, C.P. Njoku, Heavy metals contamination of solid waste disposal sites in Umuahia, Abia State, *Journal of Chemical Society of Nigeria*, **46**(6), 978-984 (2021).
14. E.C. Ogoko, S.A. Onyemelukwe, H.I. Kelle, I. Iroegbulem, D. Emeziem, A.A. Fagbohun, Health risk assessment of heavy metals in drinking water from Iponri water treatment plant, Lagos water corporation Nigeria, *Ovidius University Annals of Chemistry*, **34**(1), 41-49 (2023). Doi: <https://doi.org/10.2478/auoc-2023-0007>

15. O. Maxwell, H. Wagiran, Tectonic and radioactivity impacts of ^{238}U on ground-water-based drinking water at Gosa and Lugbe areas of Abuja, North Central Nigeria, *Journal of Nuclear Science and Technology*, **52**(12), 1496-1503 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1080/00223131.2015.1015467>
16. D.K. Boah, S.B. Twum, K.B. Pelig-Ba, Mathematical computation of water quality index of Veia Dam in upper east region of Ghana, *Environmental Science*, **3**(1), 11-16 (2015). <http://dx.doi.org/10.12988/es.2015.4116>
17. US Environmental Protection Agency, *Human Health Risk Assessment*, USEPA, Washington, D.C., 2014. URL: <https://www.epa.gov/risk/human-health-risk-assessment>
18. A.O. Omali, J.T. Arogundade, D. Snow, Assessment of health risks associated with contaminants in groundwater in the catchment area of selected dumpsites in Abuja north central Nigeria, *Discover Environment*, **1**, 7 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1007/s44274-023-00001-5>
19. A.O. Akinpelu, O.O. Oyewole, B.A. Adekanla, Body size perceptions and weight status of adults in a Nigerian rural community, *Annals of Medical and Health Science*, **5**(5), 358-364 (2015). URL: <https://www.ajol.info/index.php/amhsr/article/view/122564>
20. H.I. Kelle, E.C. Ogoko, P.I. Udeozo, D. Achem, J.O. Otumala, Health risk assessment of exposure to heavy metals in rice grown in Nigeria, *Pacific Journal of Science and Technology*, **22**(1), 262-273 (2021). URL: https://www.akamai.university/uploads/1/2/7/7/127725089/pjst22_1_262.pdf
21. H.I. Kelle, E.C. Ogoko, J.K. Nduka, P.I. Udeozo, M.C. Ubani, Health risk assessment of heavy metal exposures through edible clay from south-eastern and south-southern Nigeria, *Pacific Journal of Science and Technology*, **23**(1), 113-123 (2022). URL: https://www.akamai.university/uploads/1/2/7/7/127725089/pjst23_1_113.pdf
22. C.P. Gerba, Risk Assessment, in: M.L. Brusseau, I.L. Pepper, C.P. Gerba (editors), *Environmental and Pollution Science*, Elsevier, Inc., Amsterdam, 2019.
23. A.A. Mohammadi, A. Zarei, S. Majidi, A. Ghaderpoury, Y. Hashempour, M.H. Saghi, A. Alinejad, M. Yousefi, N. Hosseingholizadeh, M. Ghaderpoori, Carcinogenic and non-carcinogenic health risk assessment of heavy metals in drinking water of Khorramabad, Iran, *MethodsX*, **6**, 1642-1651 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.07.017>

24. The World Bank, *Life expectancy at birth, and total (years) - Nigeria*, 2018. URL: <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.LE00.IN?locations=NG>
25. C.C. Onoyima, W.A. Ibraheem, Assessment of water quality of shallow aquifer resources of Agbabu, Ondo State, Nigeria, *ChemSearch Journal*, **12**(2), 41-49 (2021). URL: <https://www.ajol.info/index.php/csj/article/view/220156>
26. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation (APHA, AWWA and WEF), *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th ed., Washington, D.C., 1998. URL: <https://www.standardmethods.org/doi/epdf/10.2105/SMWW.2882.180>
27. L.A. Senior, *Groundwater-Quality Assessment, Pike County, Pennsylvania, 2007*, U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2009-5129, 2009. 64 p. URL: <https://pubs.usgs.gov/sir/2009/5129/pdf/sir2009-5129.pdf>
28. E.C. Ogoko, O.S. Ajani, Investigation on the quality of water from Jabi Lake in Abuja, Nigeria, *Journal of Chemical Society of Nigeria*, **45**(5), 881-889 (2020). Doi: <https://doi.org/10.46602/jcsn.v45i5.514>
29. B. Narayana, K. Sunil, A spectrophotometric method for the determination of nitrite and nitrate, *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, **4**(2), 204-214 (2009). URL: <http://eurasianjournals.com/EJAC/index.php/ej/article/view/378>
30. M.D. Sa'id, A.M. Mahmud, Spectrophotometric determination of nitrate and phosphate levels in drinking water samples in the vicinity of irrigated farmlands of Kura Town, Kano State – Nigeria, *ChemSearch Journal*, **4**(1), 47-50 (2013). URL: <https://www.ajol.info/index.php/csj/article/view/115423>
31. L.H.M. Carvalho, T. De Koe, P.B. Tavares, An improved molybdenum blue method for simultaneous determination of inorganic phosphate and arsenate, *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, **1**(1), 13-19 (1998).
32. S. Pradhan, M.R. Pokhrel, Spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juice, fertilizer, detergent and water samples by molybdenum blue method, *Scientific World*, **11**(11), 58- 62 (2013). Doi: <https://doi.org/10.3126/sw.v11i11.9139>

33. M. Shukla, S. Arya, Determination of chloride ion (Cl^-) concentration in Ganga River water by Mohr method at Kanpur, India, *Green Chemistry and Technology Letters*, **4**(1), 06-08 (2018). Doi: <https://doi.org/10.18510/gctl.2018.412>
34. AOAC International, Official Methods of Analysis, 21st ed., Official Method 2015.06, AOAC International, Rockville MD, USA, 2015. URL: <https://www.aoac.org/resources/official-methods-of-analysis-revisions-to-21st-edition/>
35. World Health Organization, *Guidelines for Drinking-water Quality*, 4th ed., WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland, 2011. URL: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf?sequence=1
36. E.O. Longe, M.R. Balogun, Groundwater quality assessment near a municipal landfill, Lagos, Nigeria, *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, **2**(1), 39-44 (2010). URL: <https://www.maxwellsci.com/print/rja-set/v2-39-44.pdf>
37. L.O. Saheed, S.O. Azeez, A.A. Jimoh, V.A. Obaro, S.A. Adepoju, Assessment of some heavy metals concentrations in soil and groundwater around refuse dumpsite in Ibadan metropolis Nigeria, *Nigerian Journal of Technology*, **39**(1), 301-305 (2020). Doi: <https://doi.org/10.4314/njt.v39i1.33>
38. D.C. Ozoko, I.L. Onyekwelu, O.P. Aghamelu, Multivariate and health risks analysis of heavy metals in natural water sources around Enugu dumpsite, southeastern Nigeria, *Applied Water Science*, **12**, 224 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13201-022-01746-9>
39. World Health Organization, *Guidelines for drinking-water quality, 3th ed. Incorporating the first and second addenda, Volume 1. Recommendations*, Geneva, Switzerland, 2008. URL: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/204411/9789241547611_eng.pdf?sequence=1
40. O.A. Charles, O.A. Olabanji, A.J. Abimbola, A.O. Olamide, Assessing the effect of a dumpsite on groundwater quality: A case study of Aduramigba Estate within Osogbo Metropolis, *Journal of Environment and Earth Science*, **3**(1), 120-130 (2013). URL: <https://www.iiste.org/Journals/index.php/JEES/article/view-File/4014/4067>

41. E.C. Ogoko, E. Donald, Water quality characteristics of surface water and accumulation of heavy metals in sediments and fish of Imo River, Imo State, *Journal of Chemical Society of Nigeria*, **43**(4), 713-720 (2018). URL: <https://journals.chemsociety.org.ng/index.php/jcsn/article/view/213>
42. World Health Organization, *Guidelines for drinking-water quality, fourth edition, incorporating the first addendum*, Geneva, Switzerland, 2011. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>
43. Technical Committee for Standard for Drinking Water Quality, *Nigerian Standard for Drinking Water Quality (NSDWQ)*, Nigerian Industrial Standard NIS 554, Standard Organization of Nigeria, 2015. 28 p. URL: <https://africa-check.org/sites/default/files/Nigerian-Standard-for-Drinking-Water-Quality-NIS-554-2015.pdf>
44. O.K. Adeyemo, I.O. Ayodeji, C.O. Aiki-Raji, The water quality and sanitary conditions in a major Abattoir (Bodija) in Ibadan-Nigeria, *African Journal of Biomedical Research*, **1**(1-2), 51-55 (2002). URL: <https://www.ajol.info/index.php/ajbr/article/view/53976>
45. B.A. Adelekan, K.D. Abegunde, Heavy metals contamination of soil and ground-water at automobile mechanic villages in Ibadan-Nigeria, *International Journal of the Physical Sciences*, **6**(5), 1045-1058 (2011). URL: <https://academicjournals.org/journal/IJPS/article-full-text-pdf/E2C345627083>
46. FAO/WHO, *Report of the 33rd Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants*, Joint Codex Alimentarius Commission, FAO/WHO Food Standards Program, ALINORM 01/12A, 2001. 300 p. URL: <https://www.fao.org/input/download/report/27/Al0112Ae.pdf>
47. International Agency Research Cancer, *IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans*, Volumes 1-125, 2012. URL: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>
48. I.T. Enitan, A.M. Enitan, J.O. Odiyo, M.M. Alhassan, Human health risk assessment of trace metals in surface water due to leachate from the municipal dumpsite by Pollution Index: A case study from Ndawuse River, Abuja, Nigeria, *Open Chemistry*, **16**(1), 214-227 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1515/chem-2018-0008>

49. Minister of Health of Canada, *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document — Nitrate and Nitrite*, Ottawa, Ontario, Canada, 2013. URL: <https://www.canada.ca/content/dam/canada/health-canada/migration/healthy-canadians/publications/healthy-living-vie-saine/water-nitrate-nitrite-eau/alt/water-nitrate-nitrite-eau-eng.pdf>
50. A.O. Majolagbe, A.A. Kasali, L.O. Ghaniyu, Quality assessment of groundwater in the vicinity of dumpsites in Ifo and Lagos, southwestern Nigeria, *Advances in Applied Science Research*, **2**(1), 289-298 (2011). URL: <https://www.primescholars.com/articles/quality-assessment-of-groundwater-in-the-vicinity-of-dumpsites-in-ifo-and-lagos-southwestern-nigeria.pdf> nigeria.pdf
51. C.I. Osu, E.C. Ogoko, Concentration levels of physicochemical parameters, nitrate and nitrite anions of flood waters from selected areas in Port-Harcourt metropolis, Nigeria, *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, **7**(2), 147-152 (2012).
52. International Programme on Chemical Safety, *WHO Human Health Risk Assessment Toolkit: Chemical Hazards*, International programme on chemical safety (Harmonization project document No. 8), World Health Organization, Geneva, 2010. p. 4. URL: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44458/9789241548076_eng.pdf?sequence=1
53. US Environmental Protection Agency, *Risk Assessment Guidance for Superfund, Volume I: Human Health Evaluation Manual (Part F, Supplemental Guidance for Inhalation Risk Assessment)*, Report EPA-540-R-070-002, USEPA, Washington, D.C., 2009. URL: <https://semspub.epa.gov/work/HQ/140530.pdf>
54. M.A. Lushenko, *A risk assessment for the ingestion of toxic chemicals in fish from Imperial Beach*, M.Sc. thesis, San Diego State University, California, 2010. 211 p. URL: <https://digitalcollections.sdsu.edu/do/13ade1b1-b750-432d-94d8-9c1f7ad51c84#page/10/mode/2up>
55. O.B. Bassey, L.O. Chukwu, Health risk assessment of heavy metals in fish (*Chrysichthys nigrodigitatus*) from two lagoons in south-western Nigeria, *Journal of Toxicology Risk Assessment*, **5**(2), 27 (2019). Doi: <https://doi.org/10.23937/2572-4061.1510027>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

J. Omada, E.C. Ogoko, H. Kelle, G. Yomi, Water quality and health risk assessment of metals within the vicinity of Gosa dumpsite, Abuja Nigeria, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 67-100 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.110647>

A descrição teórica da detecção eletroanalítica do ledol em méis, assistida pelo compósito do polímero condutor com o oxihidróxido de cobalto

Volodymyr V. Tkach^{1,2*}, Marta V. Kushnir¹, Nataliia M. Storoshchuk¹, Olga V. Luganska³, Vira V. Kopyika³, Nataliia V. Novosad³, Svitlana M. Lukanova¹, Yana G. Ivanushko⁴, Valentyna G. Ostapchuk⁴, Svitlana P. Melnychuk⁴, Petro I. Yagodynets¹, Silvio C. de Oliveira⁵, José I. Ferrão de Paiva Martins², Maria João Monteiro⁶, Zholt O. Kormosh⁷, Tetiana V. Morozova⁸

¹ Universidade Nacional de Chernivtsi, 58012, Rua de Kotsyubyns'ky, 2, Chernivtsi, Ucrânia

² Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 4200-465, Rua Dr. Roberto Frias, s/n, Porto, Portugal

³ Universidade Nacional de Zaporizhzhia, 69600, Rua de Zhukovsky, 66, Zaporizhzhya, Ucrânia

⁴ Universidade Estatal de Medicina de Bucovina, 58001, Praça Teatral, 9, Chernivtsi, Ucrânia

⁵ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Sen. Felinto. Müller, 1555, C/P. 549, 79074-460, Campo Grande, MS, Brazil

⁶ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801, Folhadela, Vila Real, Portugal

⁷ Universidade Nacional Leste-Europeia, 43000, Av. da Liberdade, 13, Luts'k, Ucrânia

⁸ Universidade Nacional de Transporte e Rodagem da Ucrânia, 02000, Rua de Omelianovych-Pavlenko, 1, Kyiv, Ucrânia

*Autor correspondente: nightwatcher2401@gmail.com

Recebido: 12 de maio de 2022

Revisado: 9 de janeiro de 2024

Aceto: 17 de janeiro de 2024

RESUMO

Introdução: Pela primeira vez se avalia teoricamente a possibilidade da detecção eletroanalítica anódica do ledol – principal toxina dos néctares e méis de algumas flores tóxicas – pelo eléctrodo, modificado pelo compósito do polímero condutor

com oxihidróxido de cobalto. **Metodologia:** A eletrooxidação do ledol dar-se-á pelo anel de ciclopropano, seguida pela oxidação do grupo alcoólico secundário em cetona. **Resultados e discussão:** A análise do modelo correspondente mediante a teoria de estabilidade linear e análise de bifurcações confirma que o oxihidróxido de cobalto em compósito com o polímero condutor pode servir de modificador de ânodo eficaz para a determinação do ledol em méis, néctares e outras fontes naturais. Como o ledol é pouco ionizado, o comportamento oscilatório causar-se-á apenas pelos efeitos da etapa eletroquímica na dupla camada elétrica (DCE). **Conclusões:** oxihidróxido de cobalto pode ser usado para a detecção de ledol para a verificação de segurança de méis.

Palavras-chave: mel, ledol, oxihidróxido de cobalto, polímero condutor, sensor eletroquímico, estado estacionário estável

SUMMARY

The theoretical description for ledol electroanalytical detection in honeys, assisted by conducting polymer/cobalt oxyhydroxide composite

Introduction: For the first time, the possibility of anodic electroanalytical detection of ledol – the main toxin in the nectars and honeys of some toxic flowers – by the electrode, modified by the conductive polymer composite with cobalt oxyhydroxide is evaluated. **Methodology:** The electrooxidation of ledol will be realized via cyclopropane ring, followed by the oxidation of the secondary alcoholic group to ketone. **Results and discussion:** Analysis of the corresponding model using linear stability theory and bifurcation analysis confirms that cobalt oxyhydroxide in composite with conductive polymer can serve as an effective anode modifier for determining ledol in honeys, nectars and other sources natural. As ledol is poorly ionized, the oscillatory behavior will only be caused by the effects of the electrochemical stage in the double electric layer (DEL). **Conclusions:** Cobalt oxyhydroxide can be used for detection of ledol for safety verification of honeys.

Keywords: honey, ledol, cobalt oxyhydroxide, conductive polymer, electrochemical sensor, stable steady state

RESUMEN

La descripción teórica de la detección electroanalítica de ledol en mieles, asistida por el compuesto del polímero conductor con el oxihidróxido de cobalto

Introducción: Por primera vez, se evalúa la posibilidad de detección electroanalítica anódica de ledol - principal toxina de los néctares y mieles de algunas flores tóxicas - mediante el electrodo modificado por el compuesto de polímero conductor con oxihidróxido de cobalto. **Metodología:** La electrooxidación del ledol se dará a través del anillo de ciclopropano, seguida de la oxidación del grupo alcohólico secundario a cetona. **Resultados y discusión:** El análisis del modelo correspondiente utilizando la teoría de la estabilidad lineal y el análisis de bifurcación confirma que el oxihidróxido de cobalto en compuesto con polímero conductor puede servir como un modificador de ánodo eficaz para determinar el ledol en mieles, néctares y otras fuentes naturales. Como el ledol está mal ionizado, el comportamiento oscilatorio sólo será causado por los efectos de la etapa electroquímica en la doble capa eléctrica (DCE). **Conclusiones:** El oxihidróxido de cobalto se puede utilizar para la detección de ledol para la verificación de la seguridad de las mieles.

Palabras clave: miel, ledol, oxihidróxido de cobalto, polímero conductor, sensor electroquímico, estado estacionario estable

INTRODUÇÃO

Mel é um dos alimentos conhecidos pela humanidade desde a Idade de Pedra [1-4]. Sob o termo “mel” geralmente se entende um líquido viscoso e intensamente doce – produto do processamento enzimático dos néctares das flores pelas abelhas. O mel tem amplo uso na cosmética e medicina popular. Os compostos principais do mel são carboidratos e polifenóis. A depender das flores de origem, os méis são classificados em monoflorais e pluriflorais.

Na maioria dos casos, o mel é seguro. Apesar disto, algumas das flores, polinizadas pelas abelhas e usadas por elas para produzir mel – uma delas – rododendro, contêm compostos tóxicos para organismo humano. O principal componente tóxico deste tipo de mel é ledol (decahidro-1,1,4,7-tetrametil-(1aR,4R,4aS,7R,7aS,7bS)-1H-cicloprop[e]azulen-4-ol, Número CAS 577-27-5, Massa Molar 222,36 g/mol, Fórmula Empírica $C_{15}H_{26}O$, Fig. 1):

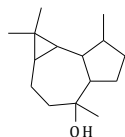


Fig. 1. Ledol

O consumo de mel, que contém médias a grandes quantidades de ledol leva à intoxicação [5-7], cujos sintomas são espasmos musculares, irritações do intestino, alucinações e até o delírio, razão por que este mel popularmente se chama “mel bêbado” (na Ucrânia) e “mel maluco” (em Portugal e no Brasil). A sua concentração superior a 15% faz o mel impróprio para consumo humano.

Ledol também é encontrado em alguns óleos naturais como o de pripiroca [8], em que a sua concentração é de até 4%. Pelas razões supracitadas, o desenvolvimento de um método, capaz de detectar a sua concentração eficaz e rapidamente é realmente atual [9-12].

Por ora, nenhum método de determinação eletroanalítica de ledol tem sido desenvolvido. Entretanto, sendo um composto policíclico, que contém um anel de ciclopropano, o ledol é electroquimicamente ativo, sendo fácil de oxidar. Neste caso, um dos modificadores de eléctrodo para a detecção eletroanalítica do ledol pode ser o oxihidróxido de cobalto [13-15], material semiconductor, frequentemente usado nos aparelhos semicondutores como substituição para o dióxido de titânio, porém, ao contrário deste, é electroquimicamente ativo. Ele, sozinho ou em compósito com polímeros condutores [16-20], podia ter um desempenho eficiente como modificador de eléctrodo para a detecção da nereistoxina.

No entretanto, o seu uso poderia acarretar uma influência comportamental, nociva à estabilidade do sistema e à sua eficiência eletroanalítica [21-23]. Destarte, o uso prático deste sistema eletroanalítico não pode ser realizado sem uma descrição teórica prévia do comportamento do sistema, o que se faz neste trabalho.

Assim, neste trabalho, pela primeira vez, faz-se uma análise comportamental do sistema eletroanalítico da detecção eletroquímica do ledol sobre o oxihidróxido de cobalto, estabilizado pelo polímero condutor. A análise comportamental do sistema eletroanalítico faz-se mediante o desenvolvimento e a análise do modelo correspondente. Com isto também se faz a comparação do comportamento do sistema eletroanalítico com o dos semelhantes [24-28].

O SISTEMA E O SEU MODELO

O grupo alcoólico ternário do ledol não sofre oxidação, por razões estéricas. Entretanto, sendo um composto carbocíclico com ciclos condensados de sete, cinco e três átomos de carbono, o ledol é fácil de oxidar. “O elo mais fraco” da molécula é o fragmento de ciclopropano, que, por tensão angular, sofre rutura, rendendo um triol com dois grupos alcoólicos ternários e um secundário. Este, em seguida, sofre a sua própria oxidação, rendendo uma hidroxiketona (Fig. 2).

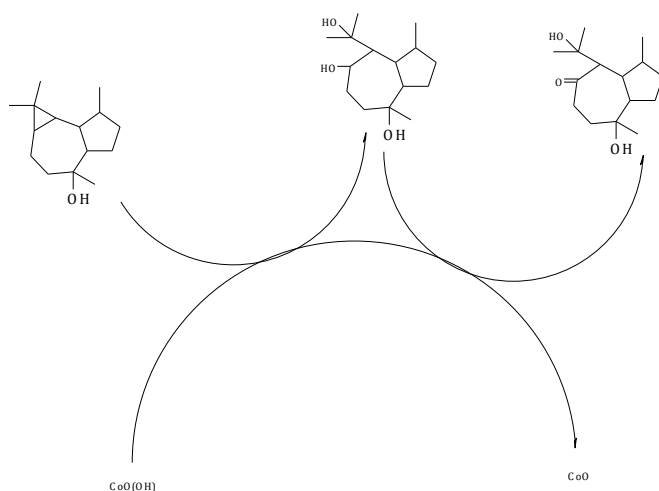


Fig. 2. Esquema de eletrooxidação de ledol, assistida pelo oxihidróxido de cobalto

O oxihidróxido de cobalto, por sua vez, regenerar-se-á na etapa eletroquímica, conforme (1):



Havendo vista o supracitado, descrevemos o comportamento do sistema eletroanalítico por um conjunto de equações diferenciais de balanço de três variáveis:

l – a concentração de ledol na camada pré-superficial;

l^* – a concentração do produto da oxidação de ledol na primeira etapa;

c – o grau de recobrimento da matriz polimérica pelo óxido de cobalto (II).

Para simplificar a modelagem, supomos que o reator esteja sob agitação intensa (destarte, podemos menosprezar o fluxo de convecção), que o eletrólito de suporte esteja em excesso (destarte, podemos menosprezar o fluxo de migração). Outrossim, supomos que o perfil concentracional das substâncias na camada pré-superficial seja lineal, e a sua espessura, constante, igual a δ .

É possível mostrar que o comportamento do sistema pode ser descrito pelo conjunto de três equações diferenciais (2):

$$\left\{ \frac{dl}{dt} = \frac{2}{\delta} \left(\frac{\Delta}{\delta} (l_0 - l) - r_{21} \right) \frac{dl^*}{dt} = \frac{2}{\delta} (r_{21} - r_{22}) \frac{dc}{dt} = \frac{1}{c} (r_{21} + r_{22} - r_1) \right. \quad (2)$$

Sendo Δ o coeficiente de difusão, l_0 é a concentração da do ledol no interior da solução, C é a concentração superficial máxima do óxido de cobalto (II) e os parâmetros r são as velocidades das reações correspondentes, que se podem calcular como:

$$r_{21} = k_{21} l (1 - c)^2 \quad (3)$$

$$r_{22} = k_{22} l * (1 - c)^2 \quad (4)$$

$$r_1 = k_1 c \exp \exp \left(\frac{F\varphi_0}{RT} \right) \quad (5)$$

Em que os parâmetros k são constantes de velocidades das respectivas reações, F é o número de Faraday, φ_0 é o salto do potencial, relativo ao potencial da carga zero, R é a constante universal de gases e T é temperatura absoluta do vaso.

Como o ledol é um composto muito pouco ionizado, é possível menosprezar o impacto das formas iônicas. Assim, a estrutura da DCE não sofrerá impactos fortes nas etapas químicas e o sistema eletroanalítico far-se-á ainda mais estável, conforme descrito embaixo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar o comportamento do sistema com a detecção eletroanalítica do ledol, assistida pelo compósito oxihidróxido de cobalto-polímero condutor, analisamos o conjunto de equações diferenciais (2) mediante a teoria de estabilidade linear. Os elementos estacionários da matriz Jacobiana para este sistema podem ser descritos como:

$$(a_{11} \ a_{12} \ a_{13} \ a_{21} \ a_{22} \ a_{23} \ a_{31} \ a_{32} \ a_{33}) \quad (6)$$

Sendo:

$$a_{11} = \frac{2}{\delta} \left(-\frac{\Delta}{\delta} - k_{21}(1-c)^2 \right) \quad (7)$$

$$a_{12} = 0 \quad (8)$$

$$a_{13} = \frac{2}{\delta} (2k_{21}l(1-c)) \quad (9)$$

$$a_{21} = \frac{2}{\delta} (k_{21}(1-c)^2) \quad (10)$$

$$a_{22} = \frac{2}{\delta} (-k_{22}(1-c)^2) \quad (11)$$

$$a_{23} = \frac{2}{\delta} (2k_{22}l * (1-c) - 2k_{21}l(1-c)) \quad (12)$$

$$a_{31} = \frac{1}{c} (k_{21}(1-c)^2) \quad (13)$$

$$a_{32} = \frac{1}{c} (k_{21}(1-c)^2) \quad (14)$$

$$a_{33} = \frac{1}{c} \left(-2k_{22}l * (1-c) - 2k_{21}l(1-c) - k_1 \exp \exp \left(\frac{F\phi_0}{RT} \right) + v \right) \quad (15)$$

Observando os elementos da diagonal principal da matriz Jacobiana (7), (11) e (15), podemos concluir que *o comportamento oscilatório* neste sistema é pode ser realizado, mas a sua satisfação pode ser realizada pelo único fator.

Para que o comportamento oscilatório seja realizado, é necessário haver elementos positivos na diagonal principal. Estes elementos são responsáveis pela positiva conexão de retorno. Neste sistema, o único elemento capaz de ser positivo é $j k_1 \exp \exp (F\phi_0)/RT > 0$ se $j > 0$. Ele descreve o fator dos impactos na DCE da etapa eletroquímica, típico para todos os sistemas semelhantes [24-28].

Assim como em [24-28], a manifestação do comportamento oscilatório (frequência, amplitude e tipo de oscilações), será dependente da composição do eletrólito de suporte, usado para o processo eletroanalítico. De qualquer maneira, esta manifestação dar-se-á nos valores de parâmetros afastados do limite de detecção, como será exposto abaixo.

A *estabilidade do estado estacionário*, por sua vez, tem uma ampla zona topológica de parâmetros, correspondente à sua realização. Como o analito e os compostos intermediários da eletrooxidação não são compostos iônicos, a zona da satisfação do critério de estabilidade será mais larga.

Para investigar a estabilidade, aplicamos ao conjunto de equações diferenciais (2) o critério Routh-Hurwitz e, para facilitar a análise do determinante, introduzimos as novas variáveis e reescrevemo-lo conforme (16):

$$\frac{4}{\delta^2 C} | -\kappa - \varepsilon \quad 0 \quad P \quad \varepsilon \quad - \Lambda \quad T - P \quad \varepsilon \quad \Lambda \quad - T - P - \Omega | \quad (16),$$

O que, conforme as propriedades do determinante, pode ser reescrito como (17)

$$\Lambda(2P\kappa - \Omega P - \Omega\varepsilon) > 0 \quad (17)$$

Abrindo os parênteses e aplicando a condição $\text{Det } J < 0$, saliente do critério, obtemos o requisito de estabilidade do estado estacionário expresso como (17):

$$\Lambda(2P\kappa - \Omega P - \Omega\varepsilon) = 0 \quad (18),$$

que se satisfaz de forma garantida, sendo positivo o valor do parâmetro Ω , o que acontece na esmagadora maioria dos casos, definindo um processo eletroanalítico eficiente cineticamente controlado. A zona topológica da satisfação do requisito (18) far-se-á mais larga que nos sistemas com formações e transformações de compostos iônicos, característicos para analitos sensíveis à concentração dos prótons ou hidroxilas.

Não havendo reações laterais, capazes de comprometer a estabilidade do analito e(ou) modificador do ânodo, a estabilidade do estado estacionário far-se-á correspondente à linearidade da dependência entre o parâmetro eletroquímico (no caso, corrente) e a concentração da toxina, o que é relacionado com o melhor desempenho do sensor, até que seja alcançado o limite de detecção.

Este limite é descrito pela *instabilidade monotônica*, descrevendo a margem entre os estados estacionários estáveis e instáveis. A sua realização é condicionada ao requisito de $\text{Det } J=0$, ou

$$\Lambda(2P\kappa - \Omega P - \Omega E) = 0 \quad (19),$$

Que é satisfeito, caso se satisfaça pelo menos um dos seguintes requisitos:

$$\Lambda = 0 \quad (20)$$

e(ou):

$$2P\kappa = \Omega(P + E) \quad (21)$$

Neste ponto, para o sistema podem coexistir vários estados instáveis, dos quais o sistema escolhe um. Este se destrói facilmente, ao se mudarem as condições e, geralmente, não se regenera, se as condições iniciais forem restauradas (o sistema passa para um estado instável diferente).

A detecção catódica do ledol também é possível, mas requer a presença de redutores mais fortes como modificadores de cátodo. A redução do ledol far-se-á pelo grupo alcoólico ternário e pelo grupo do ciclopropano com a abertura do anel e formação de um hidrocarboneto. Este caso será descrito num dos nossos próximos trabalhos.

CONCLUSÕES

A análise teórica do processo eletroanalítico da detecção do ledol, assistida pelo composto $\text{CoO}(\text{OH})$ – polímero condutor, deixou concluir que:

- se trata de um processo eletroanalítico eficiente, em que o composto de cobalto funciona como substância ativa, e o polímero desempenha o papel de mediador;
- o processo eletroanalítico é controlado tanto pela cinética do processo, como pela difusão do analito;
- a realização do comportamento oscilatório é possível, mas é causado apenas pelo fator das influências da etapa eletroquímica nas propriedades eletrofísicas da DCE.

NOTA DE AGRADECIMENTO

Volodymyr V. Tkach agradece à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro o seu apoio nos tempos difíceis para a Ucrânia e a sua ciência.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

REFERÊNCIAS

1. M.J. Walker, S. Cowen, K. Gray, P. Hancock, D.T. Burns, Honey authenticity: the opacity of analytical reports—part 2, forensic evaluative reporting as a potential solution, *NPJ Science of Food*, **6**, 12 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41538-022-00127-5>
2. E.J. de Jongh, S.L. Harper, S.S. Yamamoto, C.J. Wright, C.W. Wilkinson, S. Ghosh, S.J.G. Otto, One Health, One Hive: A scoping review of honey bees, climate change, pollutants, and antimicrobial resistance, *PLoS One*, **17**(2), e0242393 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242393>
3. A. Afshari, M. Ram, S. Mohamadi, Quality evaluation of Iranian honey collected from Khorasan Province, Iran, *International Journal of Food Science*, **2022**, 3827742 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1155/2022/3827742>
4. A. Nunes, C. Schmitz, T. Gerber, D. Nunes-Araújo, S. Moura, M. Maraschin, Typification and adulteration analysis of Brazilian honeys: a systematic review—from 2010 to 2020, *Research, Society and Development*, **11**(2), e47611226026 (2022). Doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.26026>
5. S. Ullah, S.U. Khan, T.A. Saleh, S. Fahad, Mad honey: uses, intoxicating/poisoning effects, diagnosis, and treatment, *RSC Advances*, **8**(33), 18635-18646 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1039/C8RA01924J>
6. E. Dilber, M. Kalyoncu, N. Yariş, A. Ökten, A case of mad honey poisoning presenting with convulsion: intoxication instead of alternative therapy, *Turkish Journal of Medical Sciences*, **32**(4), 361-362 (2002). URL: <https://journals.tubitak.gov.tr/cgi/viewcontent.cgi?article=4439&context=medical>

7. H. Ozhan, R. Akdemir, M. Yazici, H. Gündüz, S. Duran, C. Uyan, Cardiac emergencies caused by honey ingestion: a single centre experience, *Emergency Medicine Journal*, **21**(6), 742-744 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1136/emj.2003.009324>
8. D.P. Aykas, Determination of possible adulteration and quality assessment in commercial honey, *Foods*, **12**(3), 523 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/foods12030523>
9. A. Jesionek, L. Poblocka-Olech, B. Zabiegala, A. Bucinski, M. Krauze-Baranowska, M. Luczkiewicz, Validated HPTLC method for determination of ledol and alloaromadendrene in the essential oil fractions of *Rhododendron tomentosum* plants and *in vitro* cultures and bioautography for their activity screening, *Journal of Chromatography B*, **1086**, 63-72 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.006>
10. A.S. Tsagkaris, G.A. Koulis, G.P. Danezis, I. Martakos, M. Dasenaki, C.A. Georgiou, N.S. Thomaidis, Honey authenticity: Analytical techniques, state of the art and challenges, *RSC Advances*, **11**(19), 11273-11294 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1039/D1RA00069A>
11. R. Brodschneider, Honey bee genetic improvement, *Bee World*, **100**(1), 1 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1080/0005772X.2023.2178766>
12. S.I. Abdelwahab, A.B. Abdul, M.M. Elhassan, S. Mohan, M.Y. Ibrahim, A.A. Mariod, N.A. AlHaj, R. Abdullah, GC/MS determination of bioactive components and antibacterial properties of *Goniothalamus umbrosus* extracts, *African Journal of Biotechnology*, **8**(14), 3336-3340 (2009). Doi: <https://doi.org/10.5897/AJB09.356>
13. A. Stadnik, E.M. Caldas, A. Galli, F.J. Anaissi, Eletrodo modificado com [CoO(OH)] coloidal aplicado na detecção de ácido oxálico, *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, **7**(2), 122-128 (2015). Doi: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v7i2.572>
14. J.S. Bonini, F.Q. Mariani, E.G. de Castro, A. Galli, R. Marangoni, F.J. Anaissi, Partículas de CoO(OH) dispersas em pasta de carbono aplicado na eletrooxidação de compostos fenólicos, *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, **7**(4), 318-326 (2015). Doi: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v7i4.780>

15. S. Tursynbolat, Y. Bakytcarim, J. Huang, L. Wang, Highly sensitive simultaneous electrochemical determination of myricetin and rutin via solid phase extraction on a ternary Pt@r-GO@MWCNTs nanocomposite, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **9**(5), 358-366 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.03.009>
16. S. Sadki, P. Schottland, N. Brodie, G. Saboraud, The mechanisms of pyrrole electropolymerization, *Chemical Society Reviews*, **29**(5), 283-293 (2000). Doi: <https://doi.org/10.1039/A807124A>
17. F. Ağın, Electrochemical determination of amoxicillin on a poly (acridine orange) modified glassy carbon electrode, *Analytical Letters*, **49**(9), 1366-1378 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1101602>
18. T.D. Martins, M.L. Pacheco, R.E. Boto, P. Almeida, J.P.S. Farinha, L.V. Reis, Synthesis, characterization and protein-association of dicyanomethylene squaraine dyes, *Dyes and Pigments*, **147**, 120-129 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.070>
19. S. Sreejith, P. Carol, P. Chithra, A. Ajayaghosh, Squaraine dyes. A mine of molecular materials, *Journal of Materials Chemistry*, **18**(3), 264-274 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1039/B707734C>
20. D. Lynch, Pyrrolyl-squaraines—Fifty golden years, *Metals*, **5**(3), 1349-1370 (2015). Doi: <https://doi.org/10.3390/met5031349>
21. M.S. Ba-Shammakh, *Electropolymerization of Pyrrole on Mild Steel for Corrosion Protection*, Tese de mestrado, King Fahd University of Petroleum and Minerals, Dharan, Saudi Arabia, 2002.
22. I. Das, N.R. Agrawal, S.A. Ansari, S.K. Gupta, Pattern formation and oscillatory electropolymerization of thiophene, *Indian Journal of Chemistry*, **47A**(12), 1798-1803 (2008). URL: [https://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2565/1/IJCA%2047A\(12\)%201798-1803.pdf](https://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2565/1/IJCA%2047A(12)%201798-1803.pdf)
23. K. Aoki, I. Mukoyama, J. Chen, Competition between polymerization and dissolution of poly(3-methylthiophene) films, *Russian Journal of Electrochemistry*, **40**(3), 280-285 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1023/B:RUEL.0000019665.59805.4c>

24. I. Das, N. Goel, N.R. Agrawal, S.K. Gupta, Growth patterns of dendrimers and electric potential oscillations during electropolymerization of pyrrole using mono- and mixed surfactants, *Journal of Physical Chemistry*, **114**(40), 12888-12896 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1021/jp105183q>
25. M. Bazzouai, E.A. Bazzouai, L. Martins, J.I. Martins, Electropolymerization of pyrrole on zinc-lead-silver alloys' electrodes in neutral and acid organic media, *Synthetic Metals*, **130**(1), 73-83 (2002). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(02\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(02)00101-7)
26. I. Das, N. Goel, S.K. Gupta, N.R. Agrawal, Electropolymerization of pyrrole: Dendrimers, nano-sized patterns and oscillations in potential in presence of aromatic and aliphatic surfactants, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **670**, 1-10 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.01.023>
27. V.V. Tkach, M.V. Kushnir, S.C.d. Oliveira, I.M. Shevchenko, V.M. Odyntsova, V.M. Omelyanchik, *et al.*, Theoretical description for anti-COVID-19 drug molnupiravir electrochemical determination over the poly(1,2,4-triazole)-co-squaraine dye composite with Cobalt (III) oxyhydroxide, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, **13**(1), 74 (2023). Doi: <https://doi.org/10.33263/BRIAC131.074>
28. V.V. Tkach, M.M. Kucher, N. Slyvka, L. Vovk, M. Sokolenko, The modeling for anti-Covid-19 drug molnupiravir electrochemical sensing on C₃N₄, *Bio-interface Research in Applied Chemistry*, **13**(5), 446 (2023). Doi: <https://doi.org/10.33263/BRIAC135.446>

COMO CITAR ESTE ARTIGO

V.V. Tkach, M.V. Kushnir, N.M. Storoshchuk, O.V. Luganska, V.V. Kapiika, N.V. Novosad, S.M. Lukanova, Y.G. Ivanushko, V.G. Ostapchuk, S.P. Melnychuk, P.I. Yagodynets', S.C. de Oliveira, J.I.F.d. Paiva-Martins, M.J. Monteiro, Z.O. Kormosh, T.V. Morozova, A descrição teórica da detecção eletroanalítica do ledol em méis, assistida pelo compósito do polímero condutor com o oxihidróxido de cobalto, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 101-113 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n3.112979>

Estado de metilación de regiones promotoras de tres genes de respuesta inflamatoria en una muestra de colombianos con problemas de consumo de alcohol: un estudio exploratorio

Mauricio Rey Buitrago^{1,2*}, Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez²

¹ Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

² Departamento of Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

* Correspondencia: Mauricio Rey Buitrago. Carrera 45 No. 26-85, Instituto de Genética, Edificio 426, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia. Tel: +57 1 3165000, ext: 11610. Correo electrónico: mrey@unal.edu.co

Recibido: 5 de septiembre de 2023

Revisado: 10 de enero de 2024

Aceptado: 17 de enero de 2024

RESUMEN

Introducción: La dependencia del alcohol exhibe un patrón de herencia multifactorial. Las vías de respuesta inflamatoria han despertado un interés particular, específicamente el aspecto epigenético está muy influenciado étnicamente y por la evolución personal de la enfermedad. **Objetivo:** Comparar el estado de metilación de una región promotora con islas CpG de algunos genes candidatos a dianas farmacéuticas en la vía de respuesta inflamatoria, entre controles e individuos con consumo problemático de alcohol de una muestra de una población universitaria colombiana. **Métodos:** Previamente, se realizaron estudios sobre 29 variantes genéticas que afectan a 10 genes implicados en la respuesta inflamatoria. Luego se realizó análisis de la expresión de ARNm y proteínas de algunos de estos genes, perfilando a tres genes para estudios de metilación, a saber, *SNCA*, *MIF* e *IFNGR1*. Se analizó el estado de metilación del ADN modificado con bisulfito mediante PCR con marcaje fluorescente, electroforesis capilar y validación con secuenciación de Sanger. **Resultados:** Existen cambios en el estado de metilación del promotor de los genes *MIF* y *SNCA* en los casos. Se observó concordancia entre la expresión génica y el estado de metilación en *MIF* en la muestra general, y también con la síntesis de ARNm-*SNCA*, sin cambios apreciables en la proteína, aunque con diferencias según el sexo. **Conclusión:** Nuestro estudio proporcionó información sobre el estado de

metilación de los promotores *SNCA* y *MIF* y su relación con la expresión génica en fenotipos de consumo problemático de alcohol. Estas dos proteínas se proponen como candidatas para estudios de modelado.

Palabras Clave: Metilación, modificación con bisulfito, respuesta inflamatoria, alcohol, *SNCA*, *MIF*, *IFNGR1*

SUMMARY

Methylation status of promoter regions of three inflammatory response genes in a sample of Colombians with alcohol consumption problems - an exploratory study

Introduction: Alcohol dependence exhibits a multifactorial inheritance pattern. The inflammatory response pathways have aroused particular interest; specifically the epigenetic aspect is highly influenced by ethnicity and by the personal evolution of the disease. **Objective:** To compare the methylation status of a promoter region with CpG islands of some candidate genes for pharmaceutical targets in the inflammatory response pathway, between controls and individuals with problematic alcohol consumption from a sample of a Colombian university population. **Methods:** Previously, studies were carried out on 29 genetic variants that affect 10 genes involved in the inflammatory response. Analysis of the mRNA and protein expression of some of these genes was then performed, profiling three genes for methylation studies, namely *SNCA*, *MIF*, and *IFNGR1*. The methylation status of bisulfite-modified DNA was analyzed by PCR with fluorescent labeling, capillary electrophoresis, and validation with Sanger sequencing. **Results:** There are changes in the methylation state of the promoter of the *MIF* and *SNCA* genes in the cases. Concordance was observed between gene expression and methylation status in *MIF* in the general sample, and also in the synthesis of mRNA-*SNCA*, without appreciable changes in the protein, although with differences according to sex. **Conclusion:** Our study provided information on the methylation status of the *SNCA* and *MIF* promoters and its relationship with expression in problem drinking phenotypes. These two proteins are proposed as candidates for modeling studies.

Keywords: Methylation, bisulfite modification, inflammatory response, alcohol, *SNCA*, *MYF*, *IFNGR1*

RESUMO

Estado de metilação de regiões promotoras de três genes de resposta inflamatória em uma amostra de colombianos com problemas de consumo de álcool – um estudo exploratório

Introdução: A dependência do álcool apresenta um padrão de herança multifatorial. As vias de resposta inflamatória têm despertado particular interesse, especificamente o aspecto epigenético é altamente influenciado etnicamente e pela evolução pessoal da doença. **Objetivo:** Comparar o estado de metilação de uma região promotora com ilhas CpG de alguns genes candidatos a alvos farmacêuticos na via de resposta inflamatória, entre controles e indivíduos com consumo problemático de álcool de uma amostra de uma população universitária colombiana. **Métodos:** Anteriormente, foram realizados estudos com 29 variantes genéticas que afetam 10 genes envolvidos na resposta inflamatória. A análise do mRNA e da expressão proteica de alguns desses genes foi então realizada, traçando o perfil de três genes para estudos de metilação, a saber, *SNCA*, *MIF* e *IFNGR1*. O status de metilação do DNA modificado com bissulfito foi analisado por PCR com marcação fluorescente, eletroforese capilar e validação com sequenciamento Sanger. **Resultados:** Há alterações no estado de metilação do promotor dos genes *MIF* e *SNCA* nos casos. Foi observada concordância entre expressão gênica e status de metilação em *MIF* na amostra geral, e também com a síntese de mRNA de *SNCA*, sem alterações apreciáveis na proteína, embora com diferenças de acordo com o sexo. **Conclusão:** Nosso estudo forneceu informações sobre o estado de metilação dos promotores *SNCA* e *MIF* e sua relação com a expressão gênica em fenótipos problemáticos de consumo de álcool. Estas duas proteínas são propostas como candidatas para estudos de modelagem.

Palavras-chave: Metilação, modificação de bissulfito, resposta inflamatória, álcool, *SNCA*, *MIF*, *IFNGR1*

INTRODUCCIÓN

El alcohol se constituye en la principal sustancia psicoactiva de uso legal que se consume en Colombia, particularmente en la población universitaria, el 95 % de los estudiantes declaran haber consumido alcohol al menos una vez en la vida, el 85 % declara un consumo reciente, el 62 % declara un consumo actual, el 75 % de la población encuestada

tienen conducta de riesgo, es decir 3 de cada 4 personas pueden ser consideradas como bebedoras de riesgo o con un uso perjudicial y finalmente el 14% de la población muestra signos de dependencia [1].

La alcohol-dependencia es una enfermedad de carácter multifactorial con un componente genético de alrededor del 50%. La evidencia genética acumulada, aunque con resultados contradictorios y una gran heterogeneidad, más la concordancia incompleta entre gemelos monocigóticos en respuesta al alcohol, sugiere que además de los factores genéticos y ambientales, son importantes los epigenéticos [2]. Además, los resultados tan distintos y con escasa reproducibilidad en estudios de variantes genéticas asociados al alcoholismo nos hacen pensar que, quizás añadido a la heterogeneidad génica propia de las enfermedades de herencia multifactorial, las diferencias se deban a alteraciones en un nivel diferente a la secuencia del ADN como lo son: la expresión génica o su regulación, la interacción entre genes, las variables metabólicas, otras enfermedades concomitantes, el estado nutricional, el estado de la microbiota intestinal, etc. de los pacientes [3, 4]. El alcohol y sus “metabolitos” pueden causar cambios epigenéticos, alterando el estado de metilación del ADN, modificando las histonas y la expresión de miRNA contribuyendo a la alteración en numerosas vías de señalización celulares [5, 6].

Las alteraciones genéticas han sido ampliamente estudiadas, particularmente las variantes de nucleótido simple (SNV's) que son sustituciones de una base (nucleótido) por otra en la secuencia de un gen que debe estar en al menos el 1% de la población. Pueden ser marcadores genéticos ideales en la búsqueda de genes de susceptibilidad a una enfermedad o genes que determinan la respuesta a un fármaco determinado [7-9]. Los hallazgos más robustos de la influencia genética sobre el alcoholismo están relacionados con SNV's de genes que codifican enzimas para el metabolismo del etanol que implican la conversión del etanol a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y este último a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). En el sistema nervioso, el citocromo P4502E1 del sistema microsomal, en bebedores fuertes cobra relevancia. En Asia las variantes ADH1B*2, que genera una enzima con 100 veces más actividad y ALDH2*2 con menor actividad conllevan al fenotipo que presenta enrojecimiento facial, hipotensión, dolor de cabeza y náuseas y por tanto se consideran un factor de protección [7]. En Colombia, nuestro grupo de investigación realizó un estudio con una muestra poblacional de la región central del país encontrando que una combinación particular de genotipos de *ADH1B*, *ADH1C*, *ALDH2* y *CYP2E1* podría estar llevando a la población a un posible riesgo, dado que al presentar alelos cuyo producto enzimático permite una tasa de oxidación mayor del etanol (*ADH1B**2, *ADH1C**1, *CYP2E1*c2) combinados con el genotipo homocigoto de *ALDH2**1 aumentaría las tasas de aclaramiento del alcohol y acetaldehído dando como resultado una mayor tolerancia al consumo de cantidades elevadas de alcohol,

siendo esto un factor de riesgo para desarrollar una dependencia. Esta característica sumada a otros factores como son los sociológicos, psíquicos y ambientales contribuyen fuertemente a la susceptibilidad de una población a la enfermedad [10, 11].

Los estudios con genes candidatos y particularmente los ensayos con SNV's en humanos no son suficientes para explicar los mecanismos tan complejos del efecto neurotóxico del alcohol y los diversos fenotipos del alcoholismo. A pesar de la complejidad del panorama, los estudios de genómica total, expresión génica (transcriptómica y proteómica) nos muestran algunas redes íntimamente ligadas con los cambios funcionales que se presentan. Mediante técnicas de microarreglos y neuroproteómica se analizó la expresión génica en la corteza prefrontal de tejidos humanos postmortem de individuos con historial de adicción a distintos psicoactivos, incluido el alcohol, encontrando alteración significativa en genes de distinta localización y función celular, además de los ya mencionados anteriormente del metabolismo, se han descrito genes de transducción de señales (*CREB1*, *MAPK1*, *NTRK2*, *SOD2*), genes de inflamación (*TNFR1*, *IL-1R*, *IL-6R*, *TLR2*, *TLR4* y *NFκβ*), genes inmunitarios y de otras vías como la vía de señalización de calmodulina, genes de transito del retículo endoplasmático y aparato de Golgi, genes estructurales del cito-esqueleto, adhesión celular, receptores nucleares y moléculas que modulan la plasticidad neuronal, el circuito de recompensa, la memoria y arquitectura dendrítica [12-15].

Otra arista de esta enfermedad compleja, es el aspecto epigenético, más del 50% de estudios epigenéticos hacen referencia a la metilación del ADN por ser cambios más estables y técnicamente más fáciles de realizar, mientras la obtención de muestras adecuadas y su procesamiento para otros tipos de estudios epigenéticos es más compleja [16, 17]. En el genoma de mamíferos alrededor del 75% de dinucleótidos CpG metilados se encuentran principalmente en elementos repetitivos y de regulación génica, además alrededor de la mitad de los genes están asociados a islas CpG y su estado de metilación depende de factores externos como la dieta, estilo de vida y de condiciones fisiológicas y clínicas específicas [18].

El consumo continuo de alcohol altera la metilación del ADN de tres formas: por inhibición de las ADN metiltransferasas (*DNMT*); interfiriendo el metabolismo de carbohidratos, por cambios en el estado redox de las células; o limitando la disponibilidad de ácido fólico que disminuye la concentración de S-adenosilmetionina (SAM) [19]. Todo lo anterior, lleva a un estado de hipometilación generalizado en el organismo de consumidores crónicos de alcohol, cambiando la actividad de promotores, alterando la transcripción de genes. Aunque se ha evidenciado hipermetilación de secuencias tipo CCGG y de islas CpG en promotores de genes candidatos que han sido asociados al alcoholismo como: el transportador de dopamina (*SLC6A3*), la vasopresina (*ADH*),

el péptido natriurético atrial (*ANP*), la proopiomelanocortina (*POMC*), la proteína del retículo endoplasmático inducida por homocisteína (*HERPUD*), la alfa sinucleína (*SNCA*), la monoaminoxidasa A (*MAO A*), el transportador de serotonina (*SLC6A4*), la subunidad 2B del receptor de N-metil-D-aspartato (*GRIN2B*), la prodinorfina (*PDYN*), entre otros, mostrando diferencias en patrones de metilación entre controles y pacientes con dependencia al alcohol [20-22]. Por otro lado, los fármacos zebularina y 5-aza-2-deoxicitidina bloquean a *DNMT* alterando la metilación del promotor del factor neurotrópico derivado de cerebro (*BDNF*) y de la reelina (*RELN*) implicados en la plasticidad en el hipocampo en respuesta al alcohol [23].

Diferentes estudios han permitido establecer las redes funcionales que más frecuentemente han relacionado al alcoholismo con alteraciones del estado de metilación de islas CpG de promotores de genes involucrados en neurodesarrollo, neurocomportamiento, metabolismo de lípidos y respuesta inflamatoria. Con relación a esta última función, se ha encontrado al gen de receptor tipo toll-4 (*TLR4*) hipermetilado causando la alteración de la vía con efectos de neurotoxicidad y neurodegeneración [24]. Por otro lado, otros autores han encontrado hipometilación en genes reguladores de la respuesta inmune a través de interleuquina 1-beta (*IL-1 β*), *IL-4*, *IL-10* y factor de necrosis tumoral alpha (*TNF- α*) que se relacionan con aumento de infecciones y cáncer en el tracto digestivo en los bebedores de alcohol. En particular, el consumo de alcohol a nivel hepático puede alterar la síntesis de proteínas relacionadas con respuesta inflamatoria e inmunidad innata y particularmente el metabolito S-adenosilmetionina y, por tanto, disminuir la metilación del ADN [25]. Además, la hipometilación del promotor del gen miRNA-34a, inducida por el etanol, cambia los patrones de expresión de genes como caspasa 2 (*CASP2*), sirtuina 1 (*SIRT1*), metaloproteinasas 2 y 9 (*MMP2* y *MMP9*) relacionados con la supervivencia de los hepatocitos [26].

En este estudio seleccionamos los siguientes genes candidatos: *SNCA* (sinucleína), *MIF* (factor de inhibición de la migración de macrófagos) e *IFNGR1* (receptor tipo 1 del interferón gamma) a partir de los resultados de trabajos previos propios sobre SNV (polimorfismos de nucleótido único) en la región promotora, haplotipos, epistasis y expresión, en donde resultaron ser promisorios blancos terapéuticos [27, 28]. *SNCA* juega un papel importante en los procesos de neuroprotección y neurotoxicidad, y su ausencia aumenta la sensibilidad del sistema de recompensa cerebral en los consumidores crónicos de alcohol [29-31]. Sin embargo, esta proteína podría plegarse de forma incorrecta una vez fuera de la célula nerviosa, activando la microglía [32]. Por otro lado, el promotor de *SNCA* se ha relacionado principalmente con la variante Rep-1, un polimorfismo repetido de un dinucleótido con variados alelos en diferentes poblaciones humanas. A medida que el alelo es más corto, menor es la expresión del gen y se ha asociado con la predisposición al consumo de alcohol [30]. El riesgo de enferme-

dades neurodegenerativas aumenta con el consumo excesivo de alcohol, especialmente en individuos que tienen variantes de fácil agregación, con ciertos SNV en la región codificante del gen [30, 33]. Además, los polimorfismos en la región 3'-UTR del gen *SNCA* podrían estar relacionados con cambios que modifican la estructura secundaria del ARNm y cómo se unen a él los miARN, lo que a su vez afecta su expresión génica [34].

MIF es una proteína que controla tanto la inmunidad innata como la adquirida. En grandes bebedores de alcohol se incrementa su expresión y el uso del fármaco inhibidor, Ibudilast, muestra buenos efectos, lo que sugiere que MIF debería ser evaluado como un biomarcador para predecir la respuesta psicoterapéutica y farmacológica en pacientes con problemas de consumo de alcohol. Se considera un candidato viable para una diana terapéutica [35].

Los interferones gamma (IFN γ) son producidos por los linfocitos T CD4⁺, los NK y NKT con la función de activar las células presentadoras de antígenos como macrófagos y células dendríticas, además de funcionar como estimuladores e inmunomoduladores del sistema inmune. Además actúa como activador de iNOS e induce la síntesis de inmunoglobulinas y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II. Por otro lado, los receptores de los IFN γ (tipo I y II) se expresan de manera ubicua actuando por la vía de JAK-STAT. Es conocido que el consumo excesivo de alcohol, finalmente inhibe la respuesta inmune, aumentando la susceptibilidad a infecciones. Durante la fase inicial del alcoholismo se activa la vía de los interferones, aumentando la sensibilidad de células hepáticas al TNF- α y la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12 [36].

La epigenética puede cambiar dinámicamente en respuesta a factores externos y puede proveer un mecanismo que explique mejor cómo el ambiente afecta la expresión génica y, por tanto, los diferentes fenotipos de la enfermedad a medida que progresa (tolerancia, abstinencia, recaída, etc.) [28, 29]. Hay características particulares de las adicciones como la recaída, que difícilmente se explica por aspectos genómicos; hoy en día hay evidencias que cambios en la regulación de enzimas relacionadas con alteraciones epigenéticas podrían explicar estos fenómenos [31, 37-39]. Además, los cambios epigenéticos son dinámicos y reversibles y, por tanto, potentes candidatos para intervenciones terapéuticas [40].

En los últimos años se han desarrollado diversos estudios que muestran la alteración en estados de metilación en islas CpG de números genes de pacientes con uso problemático del alcohol, particularmente los relacionados con respuesta inflamatoria [3, 41]. El objetivo de este trabajo fue determinar el estado de metilación de islas CpG de

regiones promotoras de tres genes candidatos: *IFNGR1*, *MIF* y *SCNA*, de respuesta inflamatoria y relacionarlos con el uso problemático del alcohol, comparando controles y casos colombianos.

METODOLOGÍA

La definición del objeto de estudio.

Para el reclutamiento inicial de voluntarios se tuvo en cuenta a hombres y mujeres mayores de 18 años, nacidos en Colombia, residentes en la ciudad de Bogotá, que estuvieran vinculados a la Universidad Nacional de Colombia, ya sea como estudiantes, docentes o empleados, y que accedieran a participar en el estudio firmando consentimiento informado. A todos los sujetos incluidos en el estudio se les aplicó el cuestionario AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) como instrumento de clasificación de la gravedad de la dependencia del alcohol validado para Colombia por Campo-Arias *et al.* [42] y Ospina-Díaz *et al.* [43]. La selección de la muestra de individuos se hizo por conveniencia, el grupo control se seleccionó teniendo en cuenta que fueran personas del mismo sexo y edades similares a los casos y que obtuvieran puntajes AUDIT menores de siete, mientras que la selección de individuos con uso problemático del alcohol (casos) se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios: individuos cuyo primer problema con sustancias adictivas fuese el alcohol y que obtuvieron puntajes AUDIT mayores a siete. Por otro lado, a todos ellos, tanto controles como casos, se les realizó una entrevista semiestructurada, elaborada con base en Scoppetta *et al.* [44] y Silla-Stoel y Rosón-Hernández [45] con el objetivo de obtener mayor información sobre hábitos, frecuencia y cantidad de consumo, estado médico, antecedentes personales y familiares. De igual forma se calculó los gramos de alcohol consumidos por los participantes en el estudio teniendo en cuenta su último consumo, no olvidando que se requería una abstinencia de 48 horas [46]. Se excluyeron los voluntarios que reportaron infecciones, alergias, algún tratamiento farmacológico, enfermedades hepáticas y psiquiátricas diagnosticadas.

Del muestreo inicial en el que participaron 139 personas, 73 se clasificaron como controles y 66 como personas con consumo problemático de alcohol [27], se seleccionaron 25 personas de cada grupo para este estudio, teniendo en cuenta el valor AUDIT. 25 voluntarios con los puntajes AUDIT más bajos, igual o menores a siete para los controles y 25 con puntajes más altos, mayores a siete para el grupo de casos. Fue un estudio descriptivo con un muestreo no probabilístico por conveniencia, aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Estudio del estado de metilación

El estudio del estado de metilación de las regiones promotoras de los genes seleccionados, se realizó mediante la técnica de modificación con bisulfito del ADN, seguido de PCR específica para metilación y electroforesis capilar de productos fluoromarcados, reportado previamente por Shi [47]. Por otro lado, para la validación de los resultados se ejecutó la prueba de metilación específica mediante PCR (MSP) [48] seguida de secuenciación del ADN por el método de Sanger y Coulson [49]. Empleamos las dos técnicas, la primera de uso general y la segunda como prueba de verificación de los resultados. Se obtuvieron los perfiles de metilación de las islas CpG de segmentos de promotores de forma indirecta teniendo en cuenta que el ADN metilado migró más rápido que su contraparte no metilado. Se confirmó estos hallazgos mediante secuenciamiento directo de algunas muestras seleccionadas.

El principio de la modificación de ADN con la técnica de bisulfito de sodio se basa en su capacidad de convertir a todos los residuos de citosina (C) no metiladas en uracilos (U) mediante deaminación y su visualización en la secuencia como timina (T); la citosina metilada es resistente a la reacción y permanece como citosina [48]. Los iniciadores de PCR (Tabla 1) que se utilizaron flanqueaban las islas CpG que se modificaron por igual después del tratamiento del ADN con el bisulfito y aprovecha las diferencias de metilación en su interior para discriminar entre estas secuencias.

Tabla 1. Características de los iniciadores empleados en la amplificación por PCR de segmentos del promotor ricos en secuencias CpG de los genes seleccionados en ADN modificado por la técnica del bisulfito.

Gen	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Longitud del iniciador (pb)*	Temperatura de hibridación (°C)	Longitud del amplicón (pb)*
<i>IFNGR1</i>	Directo	TTTTTTTTTATATTTAGAA GTTTAGGTTT	28	59,5	293
	Inverso	AACCCTACTCACACCCTA CATAAC	24		
<i>SNCA</i>	Directo	AAAATTTTGAAGATATTT GAATTAAAG	27	59,9	444
	Inverso	CTAATCCTCCTCCTTCTCC TTCTC	25		
<i>MIF</i>	Directo	TAGTGAATGAATTGGG TTTATTT	25	59,8	134
	Inverso	AATCTTTCTTAATCCTTTC ACTAAATCAC	29		

*pb: pares de bases.

Para poder tener un ADN metilado de referencia, se amplificaron los segmentos de interés con iniciadores fluoromarcados y una parte de los productos se sometieron a reacción de metilación total, otra no y ambas se corrieron en electroforesis capilar y se determinaron los tamaños de estos productos. Para ello se siguieron los protocolos de la casa comercial de la enzima EcoRI Methyltransferasa descritos en detalle por Rey-Buitrago [27].

El ADN se purificó de células mononucleares de sangre mediante la técnica de precipitación salina [27, 50] y su pureza e integridad se confirmó mediante la medición espectrofotométrica y electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, teñidos con SYBR®safe. Se seleccionaron algunas muestras, se purificaron y se les realizó secuenciamiento de Sanger. Por otro lado, los productos de PCR amplificados empleando los mismos iniciadores, pero esta vez fluoro-marcados con 5-FAM (5-caxboxifluoresceína), se corrieron en electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 310. La electroforesis capilar permite separar fragmentos de ADN marcados con diferentes fluorocromos en una sola corrida utilizando un polímero lineal de acrilamida (POP-4) contenido en un capilar. Al migrar a través del capilar los fragmentos se van separando por tamaño, pasan por la ventana de detección donde un láser emite señales que excitan los fluorocromos, dicha emisión es detectada por el equipo y transformada en registros gráficos o electroferogramas. La muestra, el amplificado (entre 0,5 y 2 μ L (microlitros)) se disolvió en 12,5 μ L de formamida Hi-Di y se le adiciono 0,5 μ L de Rox-500 (Applied Biosystems), marcador interno de tamaño molecular fluoromarcado. Se desnaturalizaron las muestras por 5 minutos a 95 °C e inmediatamente fueron colocadas en frío hasta el momento de la electroforesis capilar. Los fragmentos fueron corridos a 60 °C, usando un capilar de 36 cm con módulo de corrida GS STR POP4 (1.0 mL) F.md4, en promedio 30 minutos y los resultados de las corridas se analizaron con el software GenMarker v2.2.0.

Análisis estadístico

El tamaño de los amplificados se presentó como la media $\pm$ SD (desviación estándar) del tamaño determinado y para la comparación entre casos y controles se empleó la prueba paramétrica de t para igualdad de medias o el estadístico no paramétrico prueba U de Mann-Whitney. Para determinar la distribución de los datos, se realizó la prueba de Shapiro wilk. En los casos donde no se presentó una distribución normal, se emplearon pruebas no paramétricas. También fue realizada la prueba de Levene para la homocedasticidad de las varianzas ($p>0,05$). Si los resultados presentaban normalidad y homocedasticidad, se realizó la prueba ANOVA de dos factores, con test post hoc de Bonferroni, cuando fue necesario. Se construyeron diagramas de caja con el propósito de visualizar más claramente las diferencias entre los grupos de muestras objeto de análisis, se determinó un nivel de significación de $\alpha=0,05$ en todos los casos. Todos los cálculos se ejecutaron con el programa SPSS versión 23.

RESULTADOS

De los sujetos control que se examinaron, 14 fueron mujeres y 11 hombres. En el grupo de consumo problemático de alcohol, 7 fueron mujeres y 18 fueron hombres. En los dos grupos, la edad de los participantes fue similar, con sujetos de entre 18 y 37 años, y una media de 24 y 23,5 años para controles y casos, respectivamente. Tanto en el grupo control como en el grupo con problemas con la bebida, aproximadamente el 90 % de los participantes comenzaron a beber alcohol antes de los 18 años. Los dos grupos estaban compuestos principalmente por estudiantes universitarios de pregrado, quienes predominaron en el grupo de casos y profesionales que trabajaban en la universidad, perteneciendo estos últimos en mayor proporción al grupo control (Tabla 2) [28].

Considerando que el cuestionario AUDIT es una herramienta de tamizaje, se empleó adicionalmente un cuestionario semiestructurado, en el cual se planteó una pregunta específica acerca de la cantidad media de alcohol consumida durante la última sesión, entre otras. En el ámbito de los controles, aproximadamente el 50% de los individuos consumieron principalmente cerveza, con un promedio de 37 g de alcohol por evento, mientras que aquellos con un consumo problemático de alcohol consumieron principalmente cerveza, ron y brandy, con un promedio de 209 g de alcohol por evento. La puntuación del AUDIT y los gramos de alcohol consumidos en una sesión de bebida nos permitieron categorizar claramente nuestra muestra en sujetos control y casos, que coincidieron en un 100%. La mayoría de estos últimos (>50%) podrían clasificarse como dependientes del alcohol. En cuanto al nivel socioeconómico, no encontramos diferencias entre los dos grupos, lo que representa la misma proporción de individuos de condición de clase media. La mayoría de los individuos que padecían alcohol-dependencia manifestaron el consumo de otras sustancias psicoactivas como marihuana y tabaco, con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control. Aunque el criterio de selección fue que la primera sustancia consumida fuera el alcohol, los consumidores de otras sustancias no fueron excluidos debido a la imposibilidad de encontrar bebedores exclusivos de alcohol (Tabla 2) [28].

Tabla 2. Características sociodemográficas de los participantes en el estudio [28].

Parámetro	Grupo de consumo problemático de alcohol, n (%)	Grupo de controles, n (%)	Consumo problemático de alcohol vs Controles (Valor p)
Edad: promedio $\pm$ SD (años)	23,5 $\pm$ 3,9	24,1 $\pm$ 3,9	0,937 [#]
Rango etario (años)	18-35	20-37	

Parámetro		Grupo de consumo problemático de alcohol, n (%)	Grupo de controles, n (%)	Consumo problemático de alcohol vs Controles (Valor p)
Sexo	Hombres	18 (72)	11 (44)	0,085
	Mujeres	7 (28)	14 (56)	
Puntuación AUDIT				
Rango 0-7		0 (0)	25 (100)	0,000*
Rango >7		25 (100)	0 (0)	
Consumo de alcohol por evento (g, gramos)		209±92	37±25	0,000*
Edad de inicio de consumo de alcohol (años)				0,2971
<18		22 (88)	24 (96)	
>18		3 (12)	1 (4)	
Familiares con problemas de consumo de alcohol				0,390
Si		9 (36)	12 (48)	
No		0 (0)	0 (0)	
No sabe, no responde		16 (64)	13 (52)	
Consumo de otras sustancias sicoactivas				0,000*
Sí		25 (100)	12 (48)	
No		0(0)	13 (52)	
Estrato socioeconómico				0,948
Bajo		7 (28)	6 (24)	
Medio		18 (72)	18 (72)	
Alto		0 (0)	1 (4)	

n= número de individuos.

*Diferencias estadísticamente significativas.

Análisis de varianza $p < 0,005$.

Con relación al ensayo de metilación de regiones promotoras de los genes seleccionados, la acumulación de diferencias entre C/T en los amplificados produce una diferencia en la relación masa/carga. Nuestros ensayos y los reportados en la literatura [51] mostraron que el ADN metilado migró más rápido que su contraparte no metilada. La figura 1S, muestra los electroferogramas típicos de fragmentos de ADN modificado con bisulfito y amplificado empleando iniciadores de PCR específicamente diseñados para tal fin. Se puede observar dos picos, el de mayor tamaño corresponde a ADN sin

metilar, es así como el segmento de *SNCA* generó un producto de tamaño en promedio de 450,6 pb; el *INFGRI* con un producto de 286,2 pb y *MIF* con un producto de 128,8 pb. Por otro lado, el primer pico, de menor tamaño corresponde al mismo segmento de ADN, pero metilado, con tamaños de 447,4; 284,7 y 125,5 pb, respectivamente (tabla 3, figura 1). Algunos de los productos de la PCR de este ensayo fueron sometidos a secuenciamiento, la figura 2S corresponden a electroferogramas de secuencia, se evidencia segmentos con metilación total y parcial, en este último caso dependiendo del porcentaje de islas CpG metiladas y su posición en los electroferogramas de secuencia se observa el solapamiento de los picos citosina (C) y timina (T). Optando por la electroforesis capilar, diseño ya probado previamente [47], nos muestra los tamaños de los fragmentos amplificados, lo cual dependerá del grado de metilación, aunque si estas diferencias son pequeñas o hay cambio de posición de los grupos metilados, más no en el número, no se podrán discriminar en el electroferograma.

Por otro lado, se calculó el tamaño de estos amplificados metilados y sin metilar teniendo en cuenta el aparente cambio de masa por la reacción, de acuerdo con Boyd *et al.* [51] en el contexto de análisis de metilación con bisulfito, la transición C/T resulta en aproximadamente 0,1 nucleótidos o par de bases (nt o pb) la diferencia en el cambio aparente de tamaño de los fragmentos y es aditiva. Los productos de PCR del ADN modificado con bisulfito que contenía más C, aparentemente más cortos migraron más rápido que los que contenían T, aunque podría presentarse alteraciones relacionadas con el tamaño de los amplificados (entre más grandes, más difícil su resolución) y la presencia de estructuras secundarias también puede alterar su interpretación, lo cual no fue nuestro caso. En la tabla 3 se observa la diferencia entre los segmentos metilados y no metilados experimentales y predichas, siendo mucho mayores en las predichas de *SNCA* e *INFGRI*, quizás una evidencia de la metilación parcial de las muestras y detectada en la secuenciación (ver figura 2S). Se observa claramente que la secuencia de segmentos de ADN de controles muestra mezcla de citosinas metiladas y sin metilar, lo que no se evidencia o es mucho menor en los casos.

Al promediar los resultados para el grupo de control y casos, se encontró que no había diferencias en estado de metilación del segmento del promotor rico en islas CpG del gen *INFGRI*, por lo cual no se utilizó en los subsiguientes análisis [28]. Se encontró diferencias estadísticamente significativas al analizar los segmentos del promotor rico en islas CpG de los genes *SNCA* y *MIF*, donde se evidencia más metilación en el grupo de casos de individuos con consumo problemático del alcohol (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de medias del tamaño de amplificadores de segmentos del promotor ricos en islas CpG de ADN modificado con bisulfito y corridos en electroforesis capilar de los genes *SNCA*, *INFGRI* y *MIF* en controles y casos de individuos con consumo problemático de alcohol. Entre más pequeños sean los segmentos significa mayor grado de metilación.

Gen	Distribución (Prueba Shapiro-Wilk)	Comparación varianzas (Prueba de Levene) Valor P	Comparación de medias del tamaño del ADN amplificado (test de U de Mann-Whitney), nt o pb [#]	Valor P
<i>SNCA</i>	Control: n=25 No Normal Alcohol:n=25 No Normal	0,040	449,35±0,44 448,82±0,46	0,000*
<i>INFGRI</i>	Control: n=25 No Normal Alcohol:n=25 No Normal	0,259	284,85±0,38 284,75±0,30	0,357
<i>MIF</i>	Control: n=25 No Normal Alcohol:n=25 No Normal	0,000*	125,15±0,08 124,69±0,61	0,009*

n= número de individuos.

pb: pares de bases.

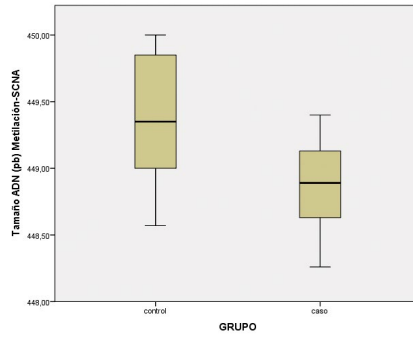
*Diferencias estadísticamente significativas p<0,005.

Tabla 4. Tamaños de grupo de segmentos génicos amplificados experimentalmente y predichos de ADN metilado y no metilado corridos en electroforesis capilar.

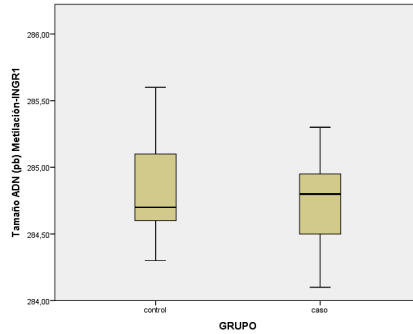
Gen	Número de islas CpG	Tamaños promedio de los amplificados observados experimentalmente (nt, pb)*			Tamaños promedio de los amplificados predichos teóricamente (nt, pb)*		
		ADN totalmente metilado	ADN sin metilar	Diferencia	ADN totalmente Metilado	ADN sin metilar	Diferencia
<i>SNCA</i>	23	447,4	450,6	3,2	441,7	446,3	4,6
<i>INFGRI</i>	25	284,7	286,2	1,5	290,5	295,5	5,0
<i>MIF</i>	9	125,2	128,8	3,6	131,1	132,9	1,8

*nt: nucleotido ó pb: pares de bases

a)



b)



c)

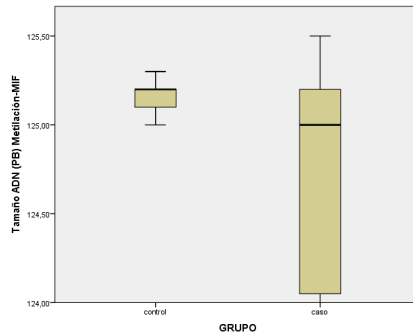


Figura 1. Tamaño de amplificadores de ADN modificado con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes *SNCA* (a), *INFR1* (b) y *MIF*(c) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles y casos (consumo problemático de alcohol). Entre más pequeños sean los segmentos significa mayor grado de metilación. Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea que representa la mediana.

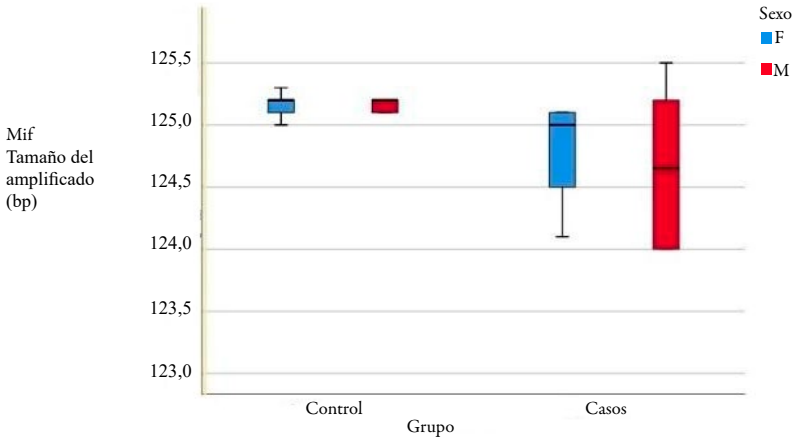
De acuerdo con los resultados de expresión [28], con relación al gen *MIF*, la transcripción relativa de ARNm disminuyó en los casos al igual que la proteína, como era de esperarse, y como se mostró arriba, el estado de metilación del promotor es mayor, lo cual se corresponde con lo esperado teóricamente, ya que la metilación de la región promotora de los genes conlleva disminución de la transcripción [52], y al producirse menos ARNm se sintetizará menos proteína, lo que es concordante con nuestros resultados. Por otro lado, en el caso del gen *SNCA*, no hubo cambios tanto en la transcripción relativa del ARNm como en la concentración proteica en la muestra general, aunque hubo diferencias estratificando por sexo (figura 2). Con relación al estado de metilación del segmento seleccionado del promotor de *SNCA* estaba más metilado en alcohol-dependientes, lo que no es concordante con los datos de expresión, aunque no hay que olvidar que la concentración de proteínas se determinó en plasma sanguíneo y los análisis de ARNm y estado de metilación del ADN se realizaron en células mononucleares de sangre, dos blancos sanguíneos diferentes, aunque son componentes de un mismo tejido y están muy interrelacionados (Tabla 5). De igual forma, debe considerarse las diferencias debidas al sexo de los participantes, pues el comportamiento de la expresión es distinto en hombres y mujeres, con aumento de ARNm y disminución de la concentración plasmática de *SNCA* en hombres [28].

Tabla 5. Comparación de medias de la medida de expresión relativa (adimensional) de ARNm en células mononucleares de sangre periférica y concentración de proteína en plasma (pg/mL), de los genes *SNCA* y *MIF* de controles y casos alcohol-dependientes [28].

Gen	Grupo	Promedio	Valor P
<i>MIF</i> n=50 mRNA	Control, n=25 Casos: Consumo problemático de alcohol, n=25	1,39±0,63 0,92±0,43	0,004*
<i>MIF</i> N=50 Proteína (pg/mL)	Control, n=25 Casos: Consumo problemático de alcohol, n=25	8898,34±5342,38 4391,42±1659,75	0,001*
<i>SNCA</i> n=50 mRNA	Control, n=25 Casos: Consumo problemático de alcohol, n=25	1,02±0,74 1,42±1,17	0,193
<i>SNCA</i> N=50 Proteína (pg/mL)	Control, n=25 Casos: Consumo problemático de alcohol, n=25	198,13±135,62 199,31±165,77	0,585

n= número de individuos. *Diferencias estadísticamente significativas $p < 0,005$.

a)



b)

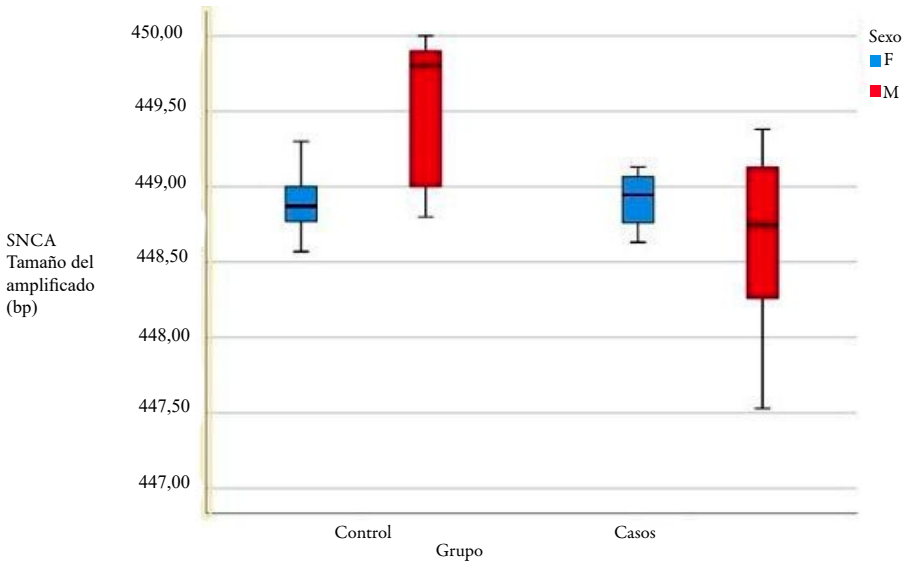


Figura 2. Tamaño de amplificadores de ADN modificado con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes *MIF* (a) y *SNCA* (b) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles y casos, estratificados por sexo. A mayor tamaño del amplificado, menor grado de metilación. Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea que representa la mediana.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha evidenciado que polimorfismos en la región promotora de un gen y que diferencias del estado de metilación de las islas CpG de esta región en genes que las posean, están asociados con su expresión alterada [53]. En este trabajo encontramos que el segmento estudiado del promotor de los genes *SNCA* y *MIF* con secuencias CpG se encontraba más metilado en individuos con uso problemático del alcohol que en los controles, hecho previamente evidenciado para *SCNA* por Bonsch *et al.* [54] que indicarían disminución de la actividad transcripcional, lo que efectivamente se observó al analizar las tasas de transcripción y concentración proteica de MIF, y sin cambios para *SNCA* en la muestra general [55, 56]. Por otro lado, al estratificar por sexo se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres, siendo los casos de hombres los que presentan mayor grado de metilación para las regiones promotoras de los dos genes (ver figura 2) y menor expresión proteica. De igual forma, se encuentran diferencias en metilación si estratificamos por edad, en el rango de edad de 18 a 30 años en el promotor de MIF y SNCA que están más metilados en casos que en los controles (datos no mostrados) [27], lo que coincide parcialmente con lo encontrado por otros autores, pues los casos están más metilados, pero en el grupo de jóvenes y no en el de mayor edad, como otros autores lo han reportado [56], aunque hay que tener en cuenta que el gran porcentaje de individuos con problemas de consumo de alcohol de nuestro estudio, se sitúan en la franja etaria de menores de 30 años y aún no pertenecen al grupo de grandes bebedores, además, el grupo de bebedores de mayor edad es muy reducido.

El promotor de *MIF* no contiene caja TATA, contiene islas CpG (34, para ser más exactos) desde la posición +1 hasta -300 a las que se une el factor de transcripción SP1, de igual forma posee secuencias tipo CRE, c-Myb, AP-4 y AML-1A a las que se les une diversos factores de transcripción, aunque solo SP1 y CREB lo hacen de manera conjunta regulando constitutivamente la expresión de MIF [57]. De acuerdo con la literatura, la metilación de islas CpG proximales en MIF, es un evento muy raro y menos relacionado con su transcripción, siendo más probable que modificaciones de histonas como la acetilación, ubiquitinación, sumoilación, metilación y fosforilación intervengan en la remodelación de la cromatina y se constituyan en mecanismos epigenéticos fundamentales en la regulación de la expresión de MIF [58]. Para el caso del gen *SNCA* desde la posición +1 hasta -1500 encontramos alrededor de 70 islas CpG, región promotora a la cual se unen diversos factores de transcripción. Se ha hallado un factor de transcripción que se une a esa región y al intrón 1, una proteína con motivos de dedos de zinc (ZSCAN21) y existe otro factor, GATA2 que se une a la misma región reguladora y al intrón 2 regulando la expresión constitutiva del gen [58]. Para

este gen, las islas CpG se han metilado con la técnica de CRISPR-cas9 en líneas celulares en modelos *in vitro* de enfermedad de Parkinson, comprobando la disminución de su expresión [59].

La hipermetilación en estos genes *SNCA* y *MIF* podría explicarse por una alteración en la maquinaria de la metilación, es decir, en las DNMT, lo que parece ser más probable a la luz de recientes estudios. Un ejemplo de ello es la alteración de la actividad de las DNMT, claves en el proceso de metilación del promotor de los genes *reelina* y *BDNF* en el hipocampo durante la inducción de la plasticidad sináptica. Igualmente, el empleo de fármacos como la zebularina y 5-aza-2-deoxicitidina, inhibidores de DNMT, pueden bloquear este proceso de inducción [56, 60]. Por otro lado, la evidencia para el proceso contrario es más contundente, es ampliamente conocido como la avitaminosis y malnutrición que padecen los bebedores crónicos de alcohol y particularmente la deficiencia de folato y metionina necesarios para la síntesis de moléculas donantes de grupos metilo durante la metilación podrían explicar la hipometilación [25].

Los mecanismos epigenéticos son dinámicos y reversibles, agentes químicos que modifiquen la metilación del ADN y acetilación de las histonas en la cromatina podrían ser excelentes candidatos para intervenciones terapéuticas, incluso la identificación de patrones epigenéticos específicos asociados a patologías particulares podrían servir de biomarcadores para la detección, diagnóstico o intervenciones preventivas [37]. La hipermetilación de los promotores de *SNCA* y *MIF* podría constituirse en candidatos a biomarcadores de la enfermedad.

En esta área de investigación se encuentran numerosos trabajos con resultados contradictorios, algunos se han llevado a cabo en células de sangre, sin separar leucocitos de no leucocitos, sin conocer sus variaciones interindividuales. El nivel de metilación en el ADN de sangre periférica puede no reflejar lo que sucede en otros tejidos, específicamente en cerebro o células bucales, aunque algunos trabajos han mostrado su correspondencia [25, 61-63]. Faltan evidencias que relacionen las alteraciones en la metilación del ADN en los promotores y las tasas de transcripción y por ello la necesidad de realizar este tipo de ensayos.

Por otro lado, se han encontrado diferencias en estados de metilación del ADN al comparar grupos étnicos; igualmente, al comparar grupos etarios, a mayor edad, mayor grado de metilación; también hay diferencias entre sexos, los hombres presentan mayor grado de metilación que las mujeres; la exposición a sustancias químicas, hábitos alimenticios, el fumar, realizar ejercicio físico, el índice de masa corporal, y particularmente en un mismo individuo los patrones de metilación son tejido-dependientes. Por tanto, al realizar estudios de metilación se debe tener en cuenta todos los aspectos ante-

rios que generan confusión, todos ellos alteran los patrones de metilación del ADN tanto de controles como de casos. De igual forma, se ha evidenciado que la alteración del patrón de metilación del ADN en los bebedores de alcohol va a depender de la fase de la enfermedad por la que estén transcurriendo: tolerancia, ansiedad, abstinencia y si se tiene adicionalmente otras codependencias. Algunos autores, también afirman que las personas con alcoholismo exhiben una mayor aceleración de la metilación del ADN con el aumento en la edad en comparación con controles sanos en todos los tipos de tejidos estudiados [19, 25, 63-66].

En este trabajo hemos encontrado aumento en la metilación en segmentos del promotor de los genes *SNCA* y *MIF*, relacionada con la disminución en la expresión relativa de mRNA y proteína *MIF* en individuos del grupo de consumo problemático de alcohol, sin cambios en *SNCA* en la muestra general, aunque con cambios en hombres del grupo de casos, donde se observa concordancia con la expresión de proteína y no de mRNA, lo que se puede explicar quizás por eventos reguladores postranscripcionales o por la naturaleza de la muestra. Por lo tanto, las terapias epigenéticas con blancos en la respuesta inflamatoria podrían evaluarse para el manejo del alcoholismo, además que podrían constituirse en biomarcadores de diagnóstico y clasificación de subtipos de pacientes, además de ser determinados fácilmente mediante una “biopsia líquida” no invasiva. Teniendo en cuenta la importancia de caracterizar estas proteínas como posibles blancos terapéuticos, es fundamental realizar análisis bioinformáticos y funcionales adicionales para valorar mejor este papel [67]. Sería interesante a futuro realizar un estudio similar con una muestra de mayor tamaño, además de poder explorar otros aspectos epigenéticos del alcoholismo y particularmente la acetilación de histonas y la presencia de microRNA en pacientes con gran y prolongado consumo de alcohol.

AGRADECIMIENTOS

En parte, este trabajo fue apoyado por fondos de la Universidad Nacional de Colombia (código Hermes 34766). Queremos agradecer las contribuciones de Tania Martínez, por su apoyo en el trabajo con los voluntarios y pacientes. Su apoyo logístico fue fundamental. También hay que agradecer a los voluntarios que, con sus muestras biológicas y su participación en el diligenciamiento de formularios y cuestionarios, hicieron posible la investigación. Igualmente a los estudiantes de semillero y jóvenes investigadores que trabajaron arduamente en proyectos relacionados con el estudio genético de la dependencia del alcohol en Colombia.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Proyecto PRADICAN, *II Estudio Epidemiológico Andino sobre Consumo de Drogas en la Población Universitaria Informe Regional 2012*, Lima, 2013. 106 p. URL: https://www.comunidadandina.org/StaticFiles/20132718338Informe_Regional.pdf
2. A. Agrawal, M.T. Lynskey, Are there genetic influences on addiction: Evidence from family, adoption and twin studies, *Addiction*, **103**(7), 1069–1081 (2008). URL: <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2008.02213.x>
3. H. Zhang, A.I. Herman, H.R. Kranzler, R.F. Anton, H. Zhao, W. Zheng, *et al.*, Array-based profiling of DNA methylation changes associated with alcohol dependence, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **37**(s1), 108–115 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01928.x>
4. T.B. Franklin, I.M. Mansuy, Epigenetic inheritance in mammals: Evidence for the impact of adverse environmental effects, *Neurobiology of Disease*, **39**(1), 61–65 (2010). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.012>
5. X. Lin, G. Lian, S. Peng, Q. Zhao, Y. Xu, D. S. Ou-Yang, *et al.*, Reversing epigenetic alterations caused by alcohol: A promising therapeutic direction for alcoholic liver disease, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **42**(10), 1863–1873 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1111/acer.13863>
6. A. Vagga, A. Meshram, L. Kanyal, K. Meshram, Gene expression regulation by epigenetic mechanism an emerging way in alcoholics, *International Journal of Current Research and Review*, **13**(3), 43–49 (2021). Doi: <http://doi.org/10.31782/IJCRR.2021.13302>
7. S. Higuchi, S. Matsushita, T. Masaki, A. Yokoyama, M. Kimura, *et al.*, Influence of genetic variations of ethanol-metabolizing enzymes on phenotypes of alcohol-related disorders, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1025**(1), 472–480 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1196/annals.1316.058>
8. M. López-Jiménez, M. Vega-García, P. Mallorquín, *Microarrays y Biochips de ADN*, Genoma, Madrid, España, 2002.

9. E. Daudén, Farmacogenética II. Métodos moleculares de estudio, bioinformática y aspectos éticos, *Actas Dermo-Sifiliograficas*, **98**(1), 3-13 (2007). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(07\)70002-9](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(07)70002-9)
10. X.T. Castro-Matiz, F.A. Aristizabal-Gutierrez, M. Rey-Buitrago, Determination of genetic polymorphism Taqia (Ankk1) Taqib (Drd2), -141c Ins/Del (Drd2) and 40 Bp Vntr (Slc6a3) in the Colombian population and evaluation of their associations with alcoholism, *Journal of Substance Abuse & Alcoholism*, **3**(4), 1039 (2015). URL: <https://www.jscimedcentral.com/public/assets/articles/substanceabuse-3-1039.pdf>
11. M. Rey, A. Gutiérrez, B. Schroeder, W. Usaquén, A. Carracedo, I. Bustos, *et al.*, Allele frequencies for 13 STR's from two Colombian populations: Bogotá and Boyacá, *Forensic Science International*, **136**(1-3), 83–85 (2003). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00221-4](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00221-4)
12. B. Tabakoff, L. Saba, M. Printz, P. Flodman, C. Hodgkinson, D. Goldman, *et al.*, Genetical genomic determinants of alcohol consumption in rats and humans, *BMC Biology*, **7**, 70 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-70>
13. D.F. Levey, H. Le-Niculescu, J. Frank, M. Ayalew, N. Jain, B. Kirlin, *et al.*, Genetic risk prediction and neurobiological understanding of alcoholism, *Translational Psychiatry*, **4**, e391 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1038/tp.2014.29>
14. G. Egervari, C.A. Siciliano, E.L. Whiteley, D. Ron, Alcohol and the brain: From genes to circuits, *Trends in Neurosciences*, **44**(12), 1004–1015 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.09.006>
15. H. Sohma, E. Hashimoto, T. Shirasaka, R. Sunematsu, H. Ozawa, K.W. Boissl, *et al.*, Quantitative reduction of type I adenylyl cyclase in human alcoholics, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1454**(1), 11–18 (1999). Doi: [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(99\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(99)00018-6)
16. M. Verma, S. Rogers, R.L. Divi, S.D. Schully, S. Nelson, J. Su, *et al.*, Epigenetic research in cancer epidemiology: Trends, opportunities, and challenges, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **23**(2), 223–233 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0573>
17. M. Girardot, R. Feil, D. Llères, Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications, *Epigenomics*, **5**(6), 715–728 (2013). Doi: <https://doi.org/10.2217/epi.13.66>

18. T. Tatarinova, *DNA Methylation - From Genomics to Technology*, InTech, Janeza, 2012. 402 p. Doi: <https://doi.org/10.5772/2159>
19. S.D. Shukla, S. Zakhari, Epigenetics: A new frontier for alcohol research, *Alcohol Research: Current Reviews*, **35**(1), 1–2 (2013). URL: <https://arcr.niaaa.nih.gov/media/896/download?inline>
20. S.L. Hagerty, L.C. Bidwell, N. Harlaar, K.E. Hutchison, An exploratory association study of alcohol use disorder and DNA methylation, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **40**(8), 1633–1640 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1111/acer.13138>
21. C. Liu, R.E. Marioni, A.K. Hedman, L. Pfeiffer, P.C. Tsai, L.M. Reynolds, *et al.*, A DNA methylation biomarker of alcohol consumption, *Molecular Psychiatry*, **23**(2), 422–433 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1038/mp.2016.192>
22. T. Hillemecher, C. Weinland, B. Lenz, T. Kraus, A. Heberlein, A. Glahn, *et al.*, DNA methylation of the LEP gene is associated with craving during alcohol withdrawal, *Psychoneuroendocrinology*, **51**, 371–377 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.10.014>
23. L. Zhou, X. Cheng, B.A. Connolly, M.J. Dickman, P.J. Hurd, D.P. Hornby, Zebularine: A novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases, *Journal of Molecular Biology*, **321**(4), 591–599 (2002). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00676-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00676-9)
24. G. Szabo, J. Petrasek, S. Bala, Innate immunity and alcoholic liver disease, *Digestive Diseases*, **30**(Suppl. 1), 55–60 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1159/000341126>
25. M.B. Terry, L. Delgado-Cruzata, N. Vin-Raviv, H.C. Wu, R.M. Santella, DNA methylation in white blood cells, *Epigenetics*, **6**(7), 828–837 (2011). Doi: <http://doi.org/10.4161/epi.6.7.16500>
26. Y. Wan, K. McDaniel, N. Wu, S. Ramos-Lorenzo, T. Glaser, J. Venter, *et al.*, Regulation of cellular senescence by miR-34a in alcoholic liver injury, *The American Journal of Pathology*, **187**(12), 2788–2798 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.027>
27. M. Rey-Buitrago, *Variantes genéticas, expresión génica, metilación y búsqueda de blancos terapéuticos en vías de respuesta inflamatoria en una muestra de población universitaria colombiana con problemas de consumo de alcohol*, Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 2022. 231 p. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/84041>

28. M. Rey, F.A. Aristizabal, Inflammatory response genes differentially expressed in a Colombian university cohort with alcohol consumption problems, *Genetics and Molecular Research*, **22**(3), GMR19159 (2023). Doi: <https://doi.org/10.4238/gmr19159>
29. F.N. Emamzadeh, Alpha-synuclein structure, functions, and interactions, *Journal of Research in Medical Sciences*, **21**(1), 29 (2016). Doi: <http://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>
30. P. Janeczke, J.M. Lewohl, The role of α -synuclein in the pathophysiology of alcoholism, *Neurochemistry International*, **63**(3), 154–162 (2013). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.007>
31. P.J. Hamilton, E.J. Nestler, Epigenetics and addiction, *Current Opinion in Neurobiology*, **59**, 128–136 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.05.005>
32. S.G. Daniele, D. Béraud, C. Davenport, K. Cheng, H. Yin, K.A. Maguire-Zeiss, Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded α -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders, *Science Signaling*, **8**(376), ra45 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005965>
33. P. Janeczke, R.K. MacKay, R.A. Lea, P.R. Dodd, J.M. Lewohl, Reduced expression of α -synuclein in alcoholic brain: influence of SNCA -Rep1 genotype, *Addiction Biology*, **19**(3), 509–515 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2012.00495.x>
34. Y.O. Nunez, R.D. Mayfield, Understanding alcoholism through microRNA signatures in brains of human alcoholics, *Frontiers in Genetics*, **3**, 43 (2012). Doi: <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00043>
35. M.C. Petralia, E. Mazzon, K. Mangano, P. Fagone, R. Di Marco, L. Falzone, *et al.*, Transcriptomic analysis reveals moderate modulation of macrophage migration inhibitory factor superfamily genes in alcohol use disorders, *Experimental and Therapeutic Medicine*, **19**(3), 1755–1762 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8410>
36. G. Szabo, D. Catalano, G. Bellerose, P. Mandrekar, Interferon α and alcohol augment nuclear regulatory Factor- κ B activation in HepG2 cells, and interferon α increases pro-inflammatory cytokine production, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **25**(8), 1188–1197 (2001). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02335.x>

37. C.C.Y. Wong, J. Mill, C. Fernandes, Drugs and addiction: An introduction to epigenetics, *Addiction*, **106**(3), 480–489 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03321.x>
38. A.J. Robison, E.J. Nestler, Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction, *Nature Reviews Neuroscience*, **12**(11), 623–637 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1038/nrn3111>
39. J.A. Wasielewski, F.A. Holloway, Alcohol's interactions with circadian rhythms - A focus on body temperature, *Alcohol Research and Health*, **25**(2), 94–100 (2001). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6707125/pdf/arcrcr-25-2-94.pdf>
40. G. Andrés, N. Ashour, M. Sánchez-Chapado, S. Roperio, J.C. Angulo, The study of DNA methylation in urological cancer: Present and future, *Actas Urológicas Españolas*, **37**(6), 368–375 (2013). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.acuro.2013.03.001>
41. M. Fiore, F. Giampiero, How alcohol drinking affects our genes: An epigenetic point of view, *Biochemistry and Cell Biology*, **97**(4), 345–356 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0248>
42. A. Campo-Arias, M. Villamil-Vargas, E. Herazo, Confiabilidad y dimensionalidad del AUDIT en estudiantes de medicina, *Psicología desde el Caribe*, **30**(1), 21–35 (2013). URL: <http://www.scielo.org.co/pdf/psdc/v30n1/v30n1a03>
43. J.M. Ospina-Díaz, F.G. Manrique-Abril, N.E. Ariza, Confiabilidad y dimensionalidad del Cuestionario para Identificación de Trastornos Debidos al Consumo de Alcohol (AUDIT) en estudiantes universitarios de Tunja (Colombia), *Salud Uninorte* (Barranquilla), **28**(2), 276–282 (2012). URL: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v28n2/v28n2a10.pdf>
44. O. Scoppetta, A. Pérez-Gómez, C. Lanziano-Molano, Perfiles asociados al consumo de alcohol de adolescentes escolarizados mediante análisis de correspondencias múltiples, *Acta Colombiana de Psicología*, **14**(1), 139–146 (2011). URL: <http://sciELO.org.co/pdf/acp/v14n1/v14n1a12.pdf>
45. M. Silla-Stoel, B. Rosón-Hernández, Evaluación del consumo de alcohol y diagnóstico de patrón de consumo, *Trastornos Adictivos*, **11**(3), 191–199 (2009). Doi: [https://doi.org/10.1016/S1575-0973\(09\)72411-0](https://doi.org/10.1016/S1575-0973(09)72411-0)

46. Canadian Centre on Substance Use and Addiction, *Knowing your limits with alcohol: A Practical Guide to Assessing Your Drinking*, CCSA.CCDUS, Canadá, 2019. 40 p. URL: https://www.ccsa.ca/sites/default/files/2019-08/CCSA-Knowing-Your-Limits-with-Alcohol-Guide-2019-en_0.pdf
47. X. Shi, J. Li, C. Zhao, S. Lv, G. Xu, Methylation analysis of hMLH1 gene promoter by a bisulfite-sensitive single-strand conformation polymorphism–capillary electrophoresis method, *Biomedical Chromatography*, **20**(8), 815–820 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1002/bmc.606>
48. J.G. Herman, J.R. Graff, S. Myöhänen, B.D. Nelkin, S.B. Baylin, Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**(18), 9821–9826 (1996). Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821>
49. F. Sanger, A.R. Coulson, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *Journal of Molecular Biology*, **94**(3), 441–448 (1975). Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
50. S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Research*, **16**(3), 1215–1215 (1988). Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
51. V.L. Boyd, K.I. Moody, A.E. Karger, K.J. Livak, G. Zon, J.W. Burns, Methylation-dependent fragment separation: Direct detection of DNA methylation by capillary electrophoresis of PCR products from bisulfite-converted genomic DNA, *Analytical Biochemistry*, **354**(2), 266–273 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.04.009>
52. M. Nakao, Epigenetics: Interaction of DNA methylation and chromatin, *Gene*, **278**(1-2), 25–31 (2001). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00721-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00721-1)
53. B. Hoogendoorn, S.L. Coleman, C.A. Guy, S.K. Smith, M.C. O'Donovan, P.R. Buckland, Functional analysis of polymorphisms in the promoter regions of genes on 22q11, *Human Mutation*, **24**(1), 35–42 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1002/humu.20061>
54. D. Bönsch, B. Lenz, J. Kornhuber, S. Bleich, DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in patients with alcoholism, *NeuroReport*, **16**(2), 167–170 (2005). URL: https://journals.lww.com/neuroreport/Abstract/2005/02080/DNA_hypermethylation_of_the_alpha_synuclein.20.aspx

55. D. Bönsch, B. Lenz, R. Fiszer, H. Frieling, J. Kornhuber, S. Bleich, Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism, *Journal of Neural Transmission*, **113**, 1299–1304 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0413-2>
56. A. Jowaed, I. Schmitt, O. Kaut, U. Wüllner, Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains, *The Journal of Neuroscience*, **30**(18), 6355–6359 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6119-09.2010>
57. T. Roger, X. Ding, A. Chanson, P. Renner, T. Calandra, Regulation of constitutive and microbial pathogen-induced human macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene expression, *European Journal of Immunology*, **37**(12), 3509–3521 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1002/eji.200737357>
58. G. Suske, The Sp-family of transcription factors, *Gene*, **238**(2), 291–300 (1999). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00357-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00357-1)
59. B. Kantor, L. Tagliaferro, J. Gu, M. E. Zamora, E. Ilich, C. Grenier, *et al.*, Down-regulation of SNCA expression by targeted editing of DNA methylation: A potential strategy for precision therapy in PD, *Molecular Therapy*, **26**(11), 2638–2649 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.019>
60. J.M. Levenson, T.L. Roth, F.D. Lubin, C.A. Miller, I. Huang, P. Desai, *et al.*, Evidence that DNA (Cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus, *Journal of Biological Chemistry*, **281**(23), 15763–15773 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M511767200>
61. R. Zhang, Q. Miao, C. Wang, R. Zhao, W. Li, C.N. Haile, *et al.*, Genome-wide DNA methylation analysis in alcohol dependence, *Addiction Biology*, **18**(2), 392–403 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1111/adb.12037>
62. Z.Z. Zhu, L. Hou, V. Bollati, L. Tarantini, B. Marinelli, L. Cantone, *et al.*, Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: A combined analysis, *International Journal of Epidemiology*, **41**(1), 126–139 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1093/ije/dyq154>
63. S.L. Hagerty, L.C. Bidwell, N. Harlaar, K.E. Hutchison, An exploratory association study of alcohol use disorder and DNA methylation, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **40**(8), 1633–1640 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1111/acer.13138>

64. A.D. Rosen, K.D. Robertson, R.A. Hlady, C. Muench, J. Lee, R. Philibert, *et al.*, DNA methylation age is accelerated in alcohol dependence, *Translational Psychiatry*, **8**, 182 (2018). Doi: <http://doi.org/10.1038/s41398-018-0233-4>
65. H. Xu, F. Wang, H.R. Kranzler, J. Gelernter, H. Zhang, Alcohol and nicotine codependence-associated DNA methylation changes in promoter regions of addiction-related genes, *Scientific Reports*, **7**, 41816 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1038/srep41816>
66. H.R. Elliott, K. Burrows, J.L. Min, T. Tillin, D. Mason, J. Wright, *et al.*, Characterisation of ethnic differences in DNA methylation between UK-resident South Asians and Europeans, *Clinical Epigenetics*, **14**, 130 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01351-2>
67. M. Rey, F.A. Aristizabal, Computational analysis of potential therapeutic targets in the inflammatory pathway for alcoholism, *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, **8**(6), 1960–1975 (2023). Doi: <https://doi.org/10.35629/7781-080619601975>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

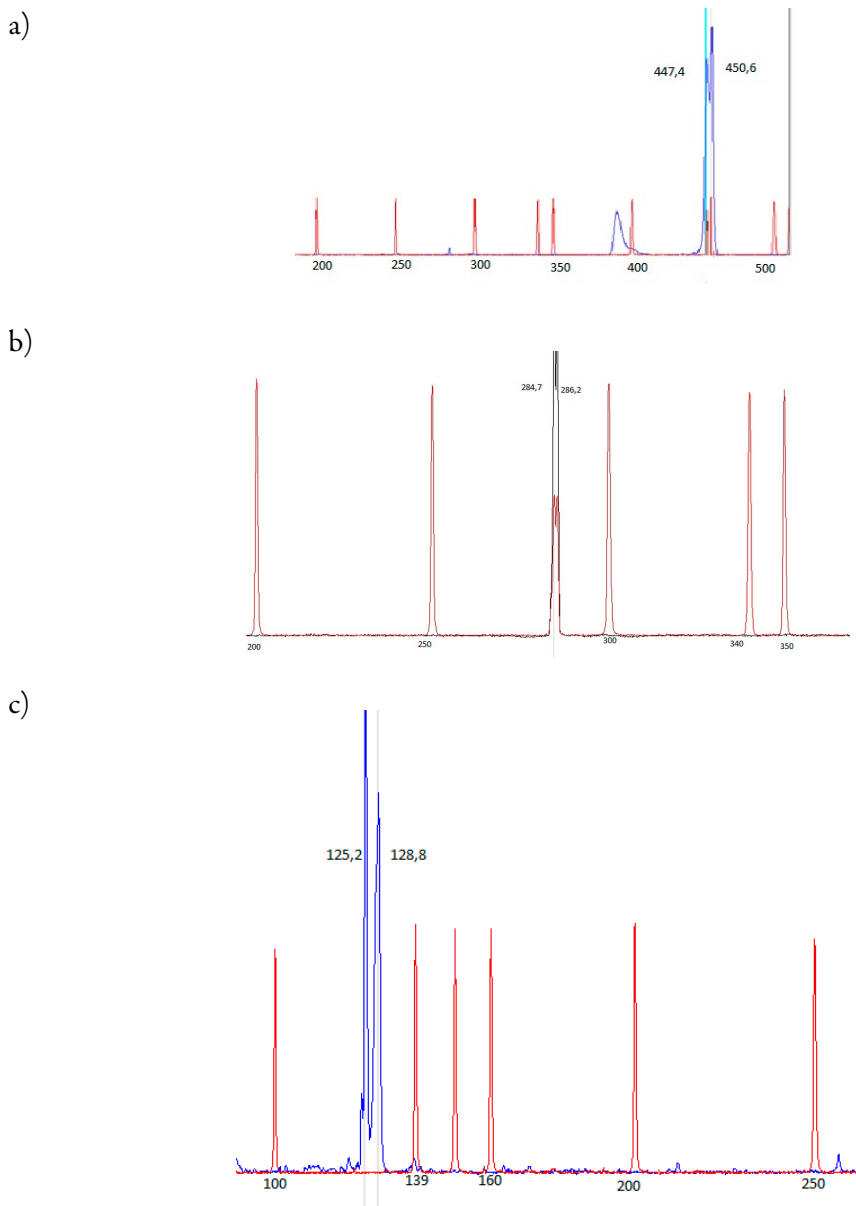
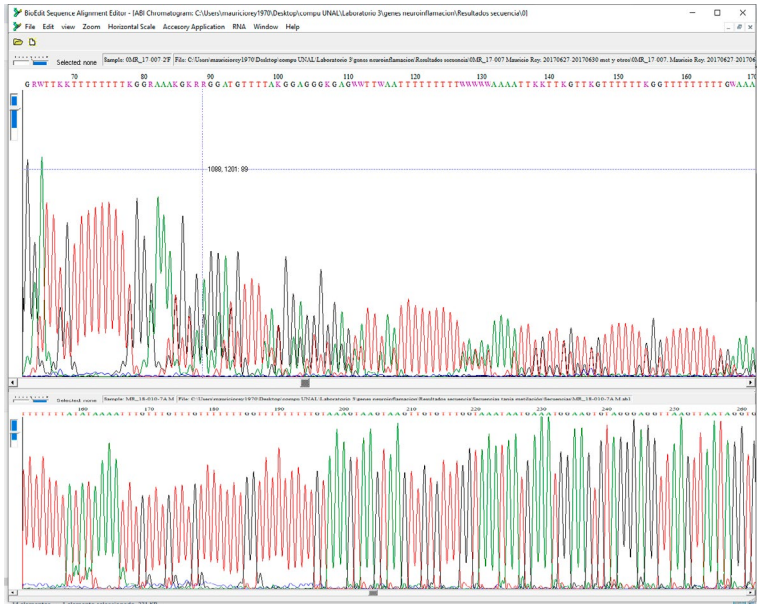


Figura 1S. Electroferogramas de amplificadores de genes seleccionados: SNCA (A), INFR1 (B) y MIF (C) que muestra el estado de metilación del segmento del promotor rico en islas CpG; el primer pico de cada figura corresponde a ADN control totalmente metilado mientras el segundo corresponde al mismo segmento sin metilar.

A)



B)



C)

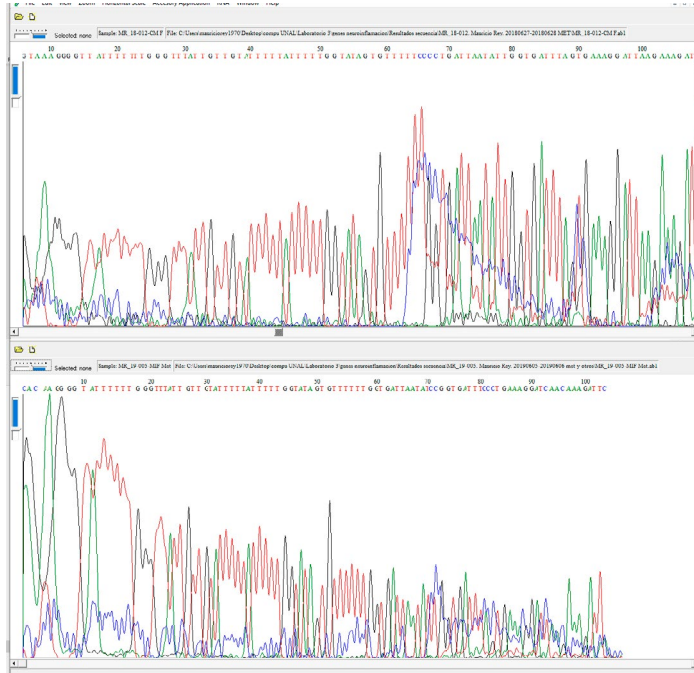


Figura 2S. Electroferogramas de secuencia de amplificados de ADN modificado con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes SNCA (A, B), INFR1 (C, D) y MIF (E, F) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles (primera imagen) y casos (segunda imagen). No olvidar: R=A o G; Y=C o T; K= T o G, W= A o T.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M. Rey Buitrago, F.A. Aristizábal-Gutiérrez, Estado de metilación de regiones promotoras de tres genes de respuesta inflamatoria en una muestra de colombianos con problemas de consumo de alcohol: un estudio exploratorio, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 114-144 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.110956>

Ambientadores antihumedad y antibacoo: desarrollo de fragancias

Angélica Sánchez Díaz¹, Lianelys Nazario Ladrón de Guevara²,

Mirna Fernández Cervera^{3*}

¹ Empresa Suchel Fragancia. Ave. Varona No. 16856, Capdevila, Boyeros, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: angelica@fragancia.co.cu

² Empresa Suchel Fragancia. Ave. Varona No. 16856, Capdevila, Boyeros, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: lianelys2506@gmail.com

³ Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Departamento de Farmacia. Universidad de La Habana, Calle 222 # 2317 e/ 23 y 31, La Lisa, La Habana, Cuba. *Autora correspondiente:
Correos electrónicos: mirnafc@ifal.uh.cu, mirnafc@gmail.com

Recibido: 20 de septiembre de 2023

Revisado: 15 de enero de 2024

Aceptado: 22 de enero de 2024

RESUMEN

Introducción: los ambientadores son productos empleados para aromatizar el ambiente, tanto de locales cerrados como abiertos, muy demandados por la red hotelera nacional. **Objetivo:** diseñar fragancias para perfumar ambientadores antihumedad y antibacoo. **Métodos:** se identificaron los componentes a incluir en las fragancias para perfumar los ambientadores. Se realizaron los estudios de estabilidad de envejecimiento natural a las fragancias seleccionadas, así como a los ambientadores, evaluando también la influencia de la luz solar en las fragancias. La evaluación sensorial se realizó a través de métodos afectivos, incluyendo pruebas de aceptación y pruebas escalares, participando jueces no entrenados. **Resultados:** se desarrollaron las fragancias con notas olfativas fresca-maderable y especiosa-maderable, para los ambientadores antihumedad y antibacoo, respectivamente. Los estudios de estabilidad demostraron la calidad física y química de ambas fragancias durante 24 meses, así como de los ambientadores. Los niveles de agrado del olor y la perfumación, de ambos productos, fueron clasificados como “Me gusta”, mientras que los de la fijación fueron “Moderada” (antihumedad) y “Duradera” (antibacoo). Las fragancias cumplieron con los criterios de calidad establecidos, al igual que los ambientadores, conservando sus notas olfativas inalteradas. El grado de aceptación y calidad de los productos estudiados, a través de métodos afectivos, demostraron su aceptación.

Palabras claves: Ambientador, antihumedad, antibacoo, estabilidad, evaluación sensorial, fragancia

SUMMARY

Anti-humidity and anti-smoking air fresheners: development of fragrances

Introduction: air fresheners are products used to aromatize the environment, both in closed and open locations, in high demand by the national hotel network. **Objective:** to design fragrances to perfume anti-humidity and anti-smoking air fresheners. **Methods:** the components to be included in the fragrances to perfume the air fresheners were identified. Natural aging stability studies were carried out on the selected fragrances, as well as on the air fresheners, also evaluating the influence of sunlight on the fragrances. Sensory evaluation was carried out through affective methods, including acceptance tests and scalar tests, with untrained judges participating. **Results:** fragrances with fresh-woody and spicy-woody olfactory notes were developed for the anti-humidity and anti-tobacco air fresheners, respectively. Stability studies demonstrated the physical and chemical quality of both fragrances for 24 months, as well as the air fresheners. The pleasantness levels of the smell and perfume of both products were classified as “I like it”, while those of the fixation were “Moderate” (anti-humidity) and “Long-lasting” (anti-smoking). The fragrances met the established quality criteria, as did the air fresheners, preserving their olfactory notes unaltered. The degree of acceptance and quality of the products studied, through affective methods, demonstrated their acceptance.

Keywords: Anti-humidity, anti-smoking, air freshner, acceptance tests, fragrance, stability

RESUMO

Ambientadores antiumidade e antitabaco: desenvolvimento de fragrâncias

Introdução: ambientadores são produtos utilizados para aromatizar o ambiente, tanto em espaços fechados como abertos, muito procurados pela rede hoteleira nacional. **Objetivo:** conceber fragrâncias para perfumar ambientadores anti-umidade e anti-tabagismo. **Métodos:** foram identificados os componentes a serem incluídos nas fragrâncias para perfumar os ambientadores. Foram realizados estudos de estabilidade ao envelhecimento natural nas fragrâncias selecionadas, bem como nos ambientadores, avaliando também a influência da luz solar nas fragrâncias.

A avaliação sensorial foi realizada por meio de métodos afetivos, incluindo testes de aceitação e testes escalares, com a participação de juízes não treinados.

Resultados: Foram desenvolvidas fragrâncias com notas olfativas amadeiradas frescas e amadeiradas picantes para os ambientadores antiumidade e antitabaco, respectivamente. Estudos de estabilidade demonstraram a qualidade física e química de ambas as fragrâncias durante 24 meses, assim como dos ambientadores. Os níveis de agradabilidade do cheiro e perfume de ambos os produtos foram classificados como “Gosto”, enquanto os de fixação foram “Moderado” (anti-umidade) e “Longa duração” (anti-tabagismo). As fragrâncias atenderam aos critérios de qualidade estabelecidos, assim como os ambientadores, preservando inalteradas suas notas olfativas. O grau de aceitação e qualidade dos produtos estudados, através de métodos afetivos, demonstraram sua aceitação.

Palavras-chave: Ambientador, antiumidade, antitabagismo, estabilidade, avaliação sensorial, fragrância

INTRODUCCIÓN

Una fragancia es una mezcla de sustancias aromáticas, sintéticas y naturales utilizadas para conferir un determinado olor al producto terminado [1]. Se caracteriza por tener una identidad propia, única y estéticamente adecuada, desde el punto de vista perceptivo [2]. La fragancia forma parte de la composición de variados productos perfumados, como los detergentes, jabones, champús, desodorantes, ambientadores, talcos y polvos, aportando su olor [3]. Su incorporación en una formulación específica trae consigo exigencias dentro de las que se destacan una buena compatibilidad, facilidad en la incorporación, estabilidad y excelente desempeño [4, 5].

En la formulación de una fragancia el perfumista determina qué materias primas aromáticas va a utilizar, combinándolas en proporciones adecuadas. Estas son descritas a través de la pirámide olfativa que indica las notas de cabeza (de salida o de cima), de corazón (de cuerpo o de medio) y de fondo. La pirámide olfativa es una de las formas de describir las fases evolutivas de una fragancia de manera estructurada y secuencial, pero no son fases estancas. Aunque en cada etapa predominan ciertas notas, la composición de un perfume es compleja, y se percibe más o menos según evoluciona la fragancia [6].

Cuba presenta un clima muy húmedo que afecta las instalaciones hoteleras, tanto en locales cerrados como áreas abiertas, por lo que se requieren productos que minimicen el efecto de los olores causados por la humedad. El olor a humedad puede minimizarse con olores cítricos, fundamentalmente, aportando un expresivo poder de irradiación

y frescor, asociados, principalmente, a la familia olfativa hespéride o cítrica que, de manera general, tienen como notas distintivas las cítricas y frescas, que se pueden combinar con otras notas frutales, picantes, herbáceas y maderables, fundamentalmente, para lograr el efecto deseado [7, 8].

Por otra parte, el olor a cigarrillo, además de ser perjudicial para la salud humana, se impregna en la piel, en los tejidos de las habitaciones como cortinas y sobrecamas, vestuario y locales, requiriendo productos que disminuyan estos olores. Para disminuir este olor son recomendables olores tenaces y persistentes como son las notas maderables que se caracterizan por ser cálidas, opulentas y profundas, que combinadas con elementos especiosos y dulces, resultan muy eficaces. Destacan entonces fragancias con notas olfativas especiosas-maderables-almizcladas, que acentúan el carácter de la composición [2, 9].

Entre los artículos de aseo personal y limpieza del hogar se encuentran los productos para la limpieza del hogar y el ambiente, incluyendo detergentes, limpiadores, ambientadores, aromatizantes, entre otros [10].

Un ambientador es tanto la sustancia, o compuesto orgánico aromático, que perfuma un ambiente, como el recipiente que sirve para contener dicho elemento. Si bien, en su origen y durante siglos, las sustancias utilizadas para perfumar un ambiente eran exclusivamente de origen vegetal (resinas, aceites esenciales, flores), muchos de los ambientadores modernos utilizan productos químicos sintéticos que facilitan su dispersión y evaporación, mezclados con otros de origen vegetal [2]. Se presentan en muy diversas formas, dependiendo básicamente de la forma elegida para su difusión, como los sólidos, líquidos, aerosoles, varillas de incienso, difusores eléctricos, velas perfumadas y geles [11-14].

Los ambientadores están constituidos por dos ingredientes básicos: las fragancias y los solventes. El agua y diversos solventes son empleados en su elaboración [11, 14, 15]. El ambientador desprende varios tipos de perfumes y diferentes olores, despertando los sentidos del ser humano, tranquilizando y relajando su mente, permitiendo la claridad y la inspiración de este. La perfumación de los ambientadores tiene como función principal mejorar sus características organolépticas, por lo que es un factor importante para la aceptación por parte del consumidor. También se utiliza para inducir beneficios adicionales a los productos ya que pueden satisfacer necesidades emocionales, aliviar estrés, crear bienestar y comunicar ideas como limpieza, frescura y suavidad [3, 5, 11, 12, 15] logrando neutralizar olores fuertes como la humedad y el tabaco.

La calidad de la fragancia de un producto determinado es el criterio más importante para determinar su aceptación, de acuerdo con una norma de calidad. A pesar de que

existen pruebas físicas y químicas, dichas pruebas tienen poco significado a menos que el requisito principal, o sea, la calidad del olor, sea satisfactorio [16].

La industria de las fragancias suele utilizar patrones propios de referencia, típicos para cada empresa, y a veces para cada producto. La calidad está determinada principalmente por sus características olfativas. Por lo tanto, son composiciones creativas únicas en su formulación, se consideran secretos industriales, no siendo posible conocer la composición exacta de sus creaciones, existiendo escasos trabajos de investigación relacionados con el desarrollo de fragancias [17].

En el presente trabajo se desarrollaron dos fragancias para perfumar ambientadores antihumedad y antitabaco. Con esta finalidad se determinaron las propiedades físicas y químicas de las fragancias diseñadas, así como los estudios de estabilidad de vida de estante y de evaluación sensorial de las fragancias y los productos perfumados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos químicos

Para el diseño de las fragancias antihumedad y antitabaco se emplearon materias primas suministradas por Robertet (Francia) y Ventós (España).

Desarrollo de las fragancias antihumedad y antitabaco

Se realizaron 17 variantes de la fragancia antihumedad (identificadas desde la L-1 hasta la L-17) que respondieran a la nota olfativa fresca-maderable. En el caso de la fragancia antitabaco se realizaron 25 variantes (identificadas desde la T-1 hasta la T-25) que respondieran a la nota olfativa especiosa-maderable.

Durante el desarrollo de ambas fragancias se hicieron cambios graduales en los componentes, desde cantidades menores a mayores, o viceversa, empleando compuestos puros o en diluciones para lograr el equilibrio y el efecto deseado en cada nota, así como la armonía de toda la composición. Cada nota y acorde diseñado se trabajó teniendo en cuenta el desempeño de sus ingredientes para abarcar los tres niveles de volatilidad de la fragancia: volatilidad alta, media y baja, asegurando de esta forma la secuencia constante en el desempeño de la fragancia.

Las materias primas utilizadas fueron debidamente analizadas para que cumplieran con las regulaciones de la Asociación Internacional para la Investigación de Fragancias (IFRA, por sus siglas en inglés) [18], teniendo especial cuidado en el empleo de las sustancias restringidas y específicas. Durante el diseño de las fragancias se incluyó el butil-hidroxi-tolueno (BHT) para evitar la oxidación de los productos.

Se elaboraron 10,0 g de cada una de las variantes, para cada fragancia, empleándose para ello una balanza técnica (ED2202S, Sartorius, Alemania). Las materias primas se fueron añadiendo al erlenmeyer a través de goteros desechables y espátulas de acero inoxidable, agitándose la mezcla hasta homogenizar.

Evaluación olfativa de las fragancias

La evaluación olfativa fue realizada por el equipo de perfumistas del Departamento Técnico de la UEB Suchel Fragancia, compuesto por seis jueces expertos [19], a través del método directo de evaluación de olores sobre tiras olfativas.

A cada una de las variantes obtenidas se les realizó el procedimiento en el horario de la mañana (de 7:30 – 10:00 am), manteniendo una frecuencia de 15 min, 3, 6, 24 y hasta 72 h, comprobando su permanencia en las tiras de papel secante, empleadas como medio inerte. Las tiras de papel secante fueron impregnadas con las muestras a analizar introduciendo una en cada frasco y se presentaron a los jueces de forma individual [17].

Los jueces procedieron a realizar la evaluación del olor olfateando cada tira aromática, la cual debía estar separada unos pocos centímetros de la nariz, sin que tuviera contacto con esta.

La selección de las fragancias se efectuó por consenso de todos los jueces, teniendo como criterio de selección la variante más equilibrada, con mejor armonía en su composición y con una permanencia en las tiras secantes de más de 72 h [17].

Elaboración de los ambientadores perfumados

A partir de la evaluación olfativa, fue seleccionada una variante antihumedad (L-15) y una antitabaco (T-2), teniendo en cuenta que las propuestas escogidas tenían el olor deseado, construido con notas de tope, medio y fondo, logrando una armonía y una elegancia singular.

Los ambientadores estaban compuestos por la fragancia seleccionada en cada caso, alcohol etílico 96° y agua destilada. Para elaborar los ambientadores se midió la cantidad de alcohol a utilizar, después se adicionó la fragancia antihumedad y/o antitabaco, posteriormente el agua destilada y finalmente, se maceró la mezcla obtenida [20]. De cada ambientador se elaboraron 4,0 L, envasándolos en bidones de polipropileno (EMI, Villa Clara, Cuba) y tapas de polipropileno (EMI, Villa Clara, Cuba).

Estabilidad de las fragancias y los ambientadores

Los estudios de estabilidad de envejecimiento natural, a las fragancias y a los ambientadores, se realizaron en el Laboratorio de Desarrollo de Suchel, perteneciente a la UEB Suchel Fragancia [1, 21].

Para el estudio de vida útil las muestras se almacenaron en anaquel a 30 ± 2 °C de temperatura y a $75,0 \pm 5$ % de humedad relativa, con una frecuencia de análisis al inicio, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses, posteriores a la elaboración de las fragancias y los ambientadores. También se colocaron muestras en la ventana, durante 90 días, para evaluar el efecto de la luz.

A las muestras analizadas se le determinaron los siguientes parámetros:

Color y apariencia: Un tubo de ensayo bien limpio se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra realizando la inspección visual.

Olor: Se realizó un análisis olfativo a través de una tira de papel secante de 1 cm de ancho por 10 cm de largo, introduciéndose un extremo en la muestra de ensayo. La valoración olfativa fue realizada por el comité de perfumistas de la entidad [1].

Índice de refracción (IR): Se empleó el refractómetro electrónico ATAGO RX-5000 (Japón). Se depositaron dos gotas de la muestra cubriendo la totalidad de la superficie del prisma a 20 °C. El procedimiento se realizó por triplicado [22].

Densidad relativa (DR): Se empleó el densitómetro electrónico Anton Paar DMA 38 (Austria) inyectando 20 μ L de la muestra a analizar a 20 °C. El procedimiento se realizó por triplicado [23].

Adicionalmente, a los parámetros anteriores, a los ambientadores se les determinó el pH y el grado alcohólico.

pH: Se empleó un electrodo de vidrio en un pH-metro Mettler Toledo FiveEasy (China). Se transfieren de 50 a 100 mL de la muestra de ensayo a un vaso de precipitados y se midió el pH, previamente calibrado el equipo. El procedimiento se realizó por triplicado [24].

Grado alcohólico: Se le determinó a cada ambientador empleando un densímetro DA-130 N (KEM, Japón). En la pantalla de función del equipo se seleccionó Alcohol y 20 °C (vol %) para la unidad de medición [25].

Evaluación sensorial de los ambientadores: métodos afectivos

El nivel de aceptación o rechazo, agrado o desagrado y preferencia de los productos elaborados, se evaluó a través de pruebas sensoriales afectivas destinadas a los consumidores, teniendo en consideración algunos atributos de interés, desde el punto de vista de las características deseadas para este tipo de cosmético (productos funcionales) [26]. Para ello se aplicaron encuestas a 100 jueces no entrenados, en diferentes instalaciones hoteleras del país.

A través de la prueba de aceptación de muestra simple o única, se determinó la aceptación o el rechazo de los productos presentados, siendo los atributos evaluados el olor y el efecto antihumedad/antitabaco.

Para evaluar el efecto antihumedad, el ambientador se aplicó en habitaciones de las plantas bajas de cada hotel, seleccionadas por la administración de cada entidad. En el caso del ambientador antitabaco se aplicó en los Salones para fumadores de cada hotel, así como en locales abiertos hoteleros y habitaciones, lugares donde acuden personas fumadoras y no fumadoras.

Los jueces participantes voluntariamente, acudían a los locales seleccionados en cada caso, respondiendo por escrito la encuesta.

Posteriormente, se realizó el análisis estadístico para determinar si la aceptación era significativa o no, empleando para ello los valores tabulados para la prueba pareada de una cola [26]. Para un nivel de significación (α) = 0,05 y el número de juicios totales (n) = 100, se estableció el valor de $n = 59$ como valor mínimo de respuestas necesarias para concluir si existían diferencias perceptibles entre las muestras.

Las pruebas escalares usando una escala hedónica (del 1 al 5) fueron aplicadas para medir el nivel de agrado del olor, la perfumación o potencia y la fijación o permanencia en el tiempo, de los productos desarrollados. En los casos del olor y la perfumación la escala empleada tuvo los criterios siguientes: 5-me gusta mucho, 4-me gusta, 3-ni me gusta ni me disgusta, 2-me disgusta y 1-me disgusta mucho. Para el nivel de agrado de la fijación o permanencia fue: 5-muy duradera, 4-duradera, 3-moderada, 2-débil y 1-escasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ante el crecimiento del turismo en el país, importante eslabón para la economía, la UEB Suchel Fragancia, a solicitud del Ministerio de Turismo, debía diseñar fragancias antihumedad y antitabaco para perfumar ambientadores que cumplieran con estas propiedades, considerándose un desarrollo sin antecedentes en la empresa.

Debido a su situación geográfica, Cuba presenta un clima tropical, siendo la humedad una amenaza constante en las instalaciones hoteleras del territorio. Para neutralizar este olor se emplearon fundamentalmente materias primas cítricas combinadas con maderas, que perduran en el tiempo. La nota de salida está formada fundamentalmente por naranja, limón y bergamota. La nota del medio se compone, principalmente, por elementos florales, como el citronelol y geraniol, y maderables como el cedramber y vertofix. Formando parte de la nota floral también están presentes la nota muguete,

aportada por el lilial lilestral, y la nota violeta, representada por la ionona metílica, las cuales actúan enriqueciendo el ramo floral. La nota de fondo presenta una excelente combinación de la vainilla con naturales como el pachulí y cedro, que logran acentuar el carácter de la composición.

Además de las notas principales, fueron incluidas otras notas olfativas que actuaron como modificadores y ayudaron a fantasear la composición, dotándola de una identidad propia. De esta forma, la fragancia antihumedad, presenta como nota olfativa fundamental la fresca-maderable, aportando una sensación de limpieza, frescura y juventud, lucidez, vigor y familiaridad.

Para el desarrollo de la fragancia antihumedad se diseñaron 17 variantes, seleccionándose por consenso de los jueces la L-15 como la variante más equilibrada y con mejor armonía en su composición, con una permanencia en las tiras secantes de más de 72 h.

Por su parte, para neutralizar el olor a tabaco se emplearon materias primas que brindan un efecto dulce, combinadas con maderas. Contiene un alto porcentaje de materias primas poco volátiles, lo que garantiza el alto grado de permanencia en el local donde se aplique. Por tanto, la nota olfativa fundamental de esta fragancia antitabaco es especiosa-maderable, que aporta también elegancia y persistencia. Evoca un carácter tranquilo, confiado, cálido y extrovertido.

La nota de salida está formada fundamentalmente por bergamota, toronja, bayas rosas y acetato de estiralilo. El medio se compone principalmente por nuez moscada, cedro, jazmín y violeta. La nota de fondo presenta vainilla, etil maltol, pachulí, vetiver y cashmeran. Los acordes empleados crean una estrella sensual y almizclada combinando la dulce vainilla con notas de maderas secas, que van dejando una huella imborrable con el pasar de las horas. De esta forma, la fragancia antitabaco, presenta como nota olfativa fundamental la especiosa-maderable.

En el caso de la fragancia antitabaco fue seleccionada, por consenso de los jueces la T-2 como la variante más equilibrada, con mejor armonía en su composición y con una permanencia en las tiras de papel secante de más de 72 h.

En las fragancias se trabajaron cuidadosamente los tres niveles de volatilidad (tope, medio y fondo) para asegurar una secuencia olfativa continua de su desarrollo y expresión, quedando constituidas las pirámides olfativas como se muestran en las figuras 1 y 2. De manera que la fragancia antihumedad pertenece a la familia olfativa hespéride y la subfamilia maderable, mientras que la fragancia antitabaco corresponde a la familia maderable y la subfamilia especiosa (en este caso, determinada por la potencia e intensidad del olor).

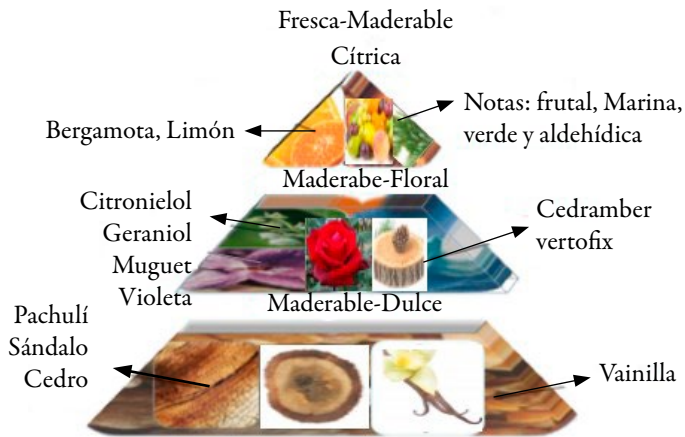


Figura 1. Pirámide olfativa de la fragancia antihumedad.



Figura 2. Pirámide olfativa de la fragancia antitabaco.

En la tabla 1 se resumen las notas olfativas de ambas fragancias, mientras que el porcentaje de los componentes volátiles de cada fragancia se resume en la tabla 2.

Tabla 1. Notas olfativas de las fragancias antihumedad y antitabaco

Nota	Porcentaje de las notas olfativas	
	Fragancia antihumedad	Fragancia antitabaco
Cítrica	25,80	3,80
Maderable	20,30	55,90
Fresca	13,00	3,00
Floral	12,60	13,05
Almizclada	8,00	3,80
Frutal	5,24	5,24
Ambarada	2,70	2,90
Aldehídica	0,48	-
Verde	0,46	0,35
Fougere	-	2,50
Marina	-	1,46
Especiosa	-	0,10

Tabla 2. Componentes volátiles (porcentaje) de las fragancias antihumedad y antitabaco

Nota	Componente	Fragancia antihumedad	Fragancia antitabaco
Cítrica	Aceite esencial de bergamota	+	2,00 %
	Aceite esencial de limón	+	-
	Acetato de linalilo	8,00 %	
	Citral	+	
	Cristales de naranja	1,00 %	
	Metil pamplemousse		+
Especiosa	Aceite esencial de nuez oscada		+
	Aceite esencial de bayas rosa		+
Fresca	Dihidromircenol	+	3,00 %
Verde	Acetato de estiralilo	0,26 %	
	Hexenol Cis-3		0,03 %
	Liffarome		+
	Vertocitral 10 % en DPG	0,20 %	-
	Undecavertol		+

(Continúa)

Nota	Componente	Fragancia antihumedad	Fragancia antitabaco
Maderable	Aceite esencial de vetiver		+
	Aceite esencial de cedro del palo ligero	+	
	Aceite esencial palo del guayaco	+	
	Aceite esencial de sándalo Indias Orientales	-	+
	Aceite esencial de pachulí	-	+
	Cashmeran		+
	Cedramber	+	
	Sandalore	+	
	Iso E super	-	15,00 %
	Vertofix	-	+
Floral	Hedione	4,00 %	+
	Acetato de bencilo	+	
	Linalol	+	1,00 %
	Acetato de geranilo	+	
	Ionona metílica		+
	Octín carbonato de metilo		+
	Geraniol	+	
	Citronelol	+	
	Nerol	+	
Marina	Calone	+	
	Helional	0,40 %	
	Melonal	+	
Almizclada	Exaltolide	+	
	Galaxolide	2,00 %	+
	Habanolide	+	
	Musccone		+
	Tonalide		+
Aldehídica	Aldehído C-10	+	
	Aldehído C-11 undecilénico	+	
Ambarada	Ambroxán	0,20 %	+
	Evernyl	+	
	Vainillina	-	+
Fougere	Cumarina		+
	Aceite esencial de lavanda		+
Frutal	Allyl amyl glicolate	+	0,04 %
	Damascona alfa	+	-
	Vertier	+	-
--	Butil hidroxi tolueno (BHT)	=	=
Inodoro	Dipropilenglicol	+	2,00 %

=: componentes en iguales proporciones, -: menor cuantía, +: mayor cuantía

De manera general, se aprecia que en la fragancia antihumedad predominan los ésteres, aceites esenciales y alcoholes, responsables de la nota cítrica, maderable, fresca, floral y almizclada, fundamentalmente. Por la característica del olor a tabaco, muy persistente, son imprescindibles para su neutralización compuestos de alta masa molecular, predominando los macrólidos, ésteres y aceites esenciales, que caracterizan la nota maderable, floral, especiosa almizclada y ambarada.

La fragancia antihumedad resultó un líquido ligeramente amarillo y transparente, caracterizada por un olor fresca-maderable en la nota fundamental, mientras que la fragancia antitabaco resultó un líquido amarillo y transparente, caracterizada por un olor especioso-maderable en la nota fundamental, como se previó durante el diseño inicial de cada una.

Los resultados correspondientes a los estudios de estabilidad de la fragancia antihumedad y el ambientador, se muestran en las tablas 3 y 4, respectivamente. En el caso de la fragancia y ambientador antitabaco se presentan en las tablas 5 y 6.

Tabla 3. Influencia de la luz y estabilidad de vida útil de la fragancia antihumedad

Mes	Vida útil		Influencia de la luz		
	IR	DR (g/cm ³)	Día	IR	DR (g/cm ³)
Inicio	1,4835 (0,0002)	0,931 (0,001)	Inicio	1,4835 (0,0002)	0,931 (0,001)
3	1,4835 (0,0000)	0,931 (0,001)	15	1,4836 (0,0001)	0,931 (0,001)
6	1,4835 (0,0004)	0,931 (0,004)	30	1,4837 (0,0004)	0,931 (0,003)
9	1,4835 (0,0008)	0,931 (0,007)	45	1,4839 (0,0010)	0,932 (0,007)
12	1,4835 (0,0003)	0,931 (0,002)	60	1,4841 (0,0006)	0,933 (0,002)
18	1,4836 (0,0011)	0,931 (0,001)	75	1,4843 (0,0000)	0,935 (0,004)
24	1,4836 (0,0000)	0,933 (0,001)	90	1,4846 (0,0014)	0,936 (0,010)

IR: índice de refracción; DR: densidad relativa

X (DS): valor medio (desviación estándar)

Tabla 4. Estabilidad de vida útil del ambientador antihumedad

Mes	IR	DR (g/cm ³)	pH	Grado alcohólico	Propiedades organolépticas
Inicio	1,2835 (0,0002)	0,851 (0,001)	5,12 (0,04)	59,20 (0,08)	Cumple
3	1,2835 (0,0004)	0,851 (0,009)	5,12 (0,01)	59,20 (0,03)	Cumple
6	1,2835 (0,0002)	0,851 (0,005)	5,12 (0,01)	59,20 (0,04)	Cumple
9	1,2835 (0,0007)	0,851 (0,003)	5,12 (0,03)	59,20 (0,01)	Cumple

(Continúa)

Mes	IR	DR (g/cm ³)	pH	Grado alcohólico	Propiedades organolépticas
12	1,2835 (0,0003)	0,851 (0,007)	5,13 (0,09)	59,20 (0,09)	Cumple
18	1,2836 (0,0001)	0,851 (0,004)	5,14 (0,05)	59,20 (0,08)	Cumple
24	1,2836 (0,0002)	0,852 (0,001)	5,16 (0,03)	59,20 (0,04)	Cumple

IR: índice de refracción; DR: densidad relativa

X (DS): valor medio (desviación estándar)

Tabla 5. Influencia de la luz y estabilidad de vida útil de la fragancia antitabaco

Mes	Vida útil		Influencia de la luz		
	IR	DR (g/cm ³)	Día	IR	DR (g/cm ³)
Inicio	1,3495 (0,0002)	0,835 (0,001)	Inicio	1,3495 (0,0002)	0,835 (0,001)
3	1,3495 (0,0000)	0,835 (0,001)	15	1,3496 (0,0001)	0,835 (0,001)
6	1,3495 (0,0004)	0,835 (0,004)	30	1,3497 (0,0004)	0,835 (0,003)
9	1,3495 (0,0008)	0,835 (0,007)	45	1,3499 (0,0010)	0,836 (0,007)
12	1,3495 (0,0003)	0,835 (0,002)	60	1,3500 (0,0006)	0,837 (0,002)
18	1,3496 (0,0011)	0,835 (0,001)	75	1,3501 (0,0000)	0,839 (0,004)
24	1,3496 (0,0000)	0,837 (0,001)	90	1,3503 (0,0014)	0,840 (0,010)

IR: índice de refracción; DR: densidad relativa

X (DS): valor medio (desviación estándar)

Tabla 6. Estabilidad de vida útil del ambientador antitabaco

Mes	IR	DR (g/cm ³)	pH	Grado alcohólico	Propiedades organolépticas
Inicio	1,3255 (0,0002)	0,762 (0,001)	5,36 (0,04)	60,20 (0,08)	Cumple
3	1,3255 (0,0004)	0,762 (0,009)	5,36 (0,01)	60,20 (0,03)	Cumple
6	1,3255 (0,0002)	0,762 (0,005)	5,36 (0,01)	60,20 (0,04)	Cumple
9	1,3255 (0,0007)	0,762 (0,003)	5,36 (0,03)	60,20 (0,01)	Cumple
12	1,3255 (0,0003)	0,762 (0,007)	5,37 (0,09)	60,20 (0,09)	Cumple
18	1,3256 (0,0001)	0,762 (0,004)	5,38 (0,05)	60,20 (0,08)	Cumple
24	1,3256 (0,0002)	0,763 (0,001)	5,40 (0,03)	60,20 (0,04)	Cumple

IR: índice de refracción; DR: densidad relativa, X (DS): valor medio (desviación estándar)

Los ambientadores están clasificados en la categoría 10A-10B* - Productos para el cuidado del hogar con mayor contacto con las manos, cumpliendo con los requerimientos sobre las materias primas empleadas, según las regulaciones de la IFRA [18].

El ambientador antihumedad resultó un líquido ligeramente amarillo, mientras que el antitabaco mostró un color amarillo. Ambos reflejaron una apariencia transparente, lo que demuestra la compatibilidad de los componentes de las fragancias en el etanol y el agua.

Como se previó en el diseño de las fragancias, los ambientadores antihumedad y antitabaco mantuvieron sus notas olfativas fundamentales: fresca-maderable y especiosa-maderable, respectivamente.

En el ambientador antihumedad, el índice de refracción arrojó un valor medio inferior al obtenido para la fragancia, lo cual es lógico debido a su dilución en etanol y agua. La densidad relativa también fue inferior al valor correspondiente a la fragancia, por la misma razón. Igual comportamiento se observa para el ambientador antitabaco.

Los valores de pH para ambos ambientadores están entre 5 y 6, considerándose adecuados, ya que están comprendidos en el rango de pH de la piel (4,5 – 6,5), garantizando la inocuidad de los productos. De la misma manera, el grado alcohólico de los ambientadores se mantuvo dentro del rango establecido (50 – 70 %) [1].

Durante el período de ensayo, las propiedades físicas y químicas de las fragancias y los ambientadores fueron adecuadas. Las fragancias conservaron tanto su carácter olfativo como su intensidad, demostrando la estabilidad de ambas fragancias, y de los ambientadores, durante dos años, bajo las condiciones de almacenamiento ensayadas [21].

De los 100 jueces no entrenados que fueron encuestados, el total de respuestas de aceptación fue considerablemente mayor que el total de respuestas de rechazo. Al 95 % le agradó el olor que exhibía cada producto, entre el 90 y el 89 % los clasificó como antihumedad/antitabaco, lo que permitió afirmar que los productos desarrollados fueron aceptados por la mayoría de los jueces afectivos. Los resultados de la prueba de estimación de significación demostraron que los valores de aceptación obtenidos superaron el valor crítico ($n=59$) para los dos atributos analizados (olor y antihumedad/antitabaco), en ambos productos.

Resumiendo los resultados de la evaluación sensorial (figura 3), se representan los niveles de agrado para los ambientadores antihumedad y antitabaco desarrollados. Para el ambientador antihumedad, en el nivel de agrado del olor predominó el criterio de “Me gusta mucho” (85), seguido de “Me gusta” (10). La puntuación total determinada a

partir de la sumatoria del criterio de aceptación de los jueces fue de 4,74, que ubica al atributo olor en la clasificación de “Me gusta”. En el nivel de agrado de la perfumación o potencia predominó el criterio de “Me gusta mucho” (85) seguido de “Me gusta” (15). La puntuación obtenida de la sumatoria del criterio de aceptación de los jueces fue de 4,85 siendo este atributo clasificado de “Me gusta”. Por último, para el nivel de agrado de la fijación o permanencia, predominó el criterio de “Duradera” (41), seguido de “Moderada” (35) y de “Muy duradera” (18), con una puntuación final de 3,35, clasificándola como “Moderada”.

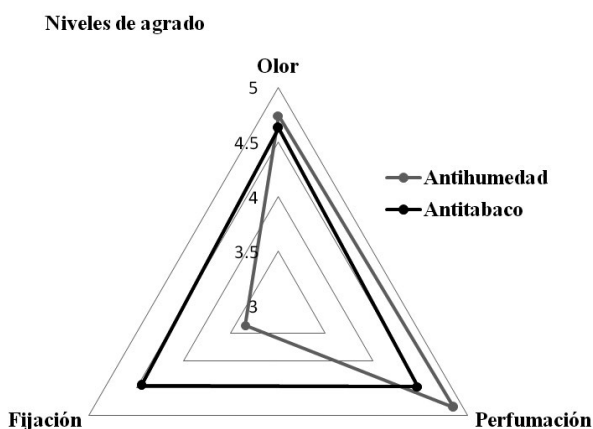


Figura 3. Niveles de agrado para los ambientadores antihumedad y antitabaco desarrollados.

En el ambientador antitabaco (Figura 3), para el nivel de agrado del olor prevaleció el criterio “Me gusta mucho” (91) seguido de “Me gusta” (4), con una puntuación final de 4,63, lo que ubica al atributo olor en la clasificación de “Me gusta”. En cuanto al nivel de agrado de la perfumación predominó el criterio de “Me gusta mucho” (51) seguido de “Me gusta” (45), y una puntuación final de 4,47 clasificándolo como “Me gusta”. En el nivel de agrado de la fijación predominó el criterio de “Muy duradera” (62) seguido de “Duradera” (21) y de “Moderada” (17), con una puntuación de 4,45, clasificando la fijación del producto perfumado de “Duradera”.

Estos resultados eran esperados por tratarse de una fragancia de la familia hespéride o cítrica (antihumedad), las que se caracterizan por ser muy volátiles, y de la familia maderable (antitabaco), constituida por elementos más tenaces y de mayor persistencia.

Se puede afirmar que los métodos afectivos utilizados en la evaluación sensorial de los ambientadores antihumedad y antitabaco, demostraron la aceptación de ambos productos para aromatizar el ambiente.

CONCLUSIONES

Los ambientadores antihumedad y antitabaco, empleando las fragancias fresca-maderable y especiosa-maderable seleccionadas, mantuvieron su estabilidad física y química durante 24 meses, conservando sus notas olfativas inalterables, cumpliendo con todos los parámetros de calidad evaluados. Los métodos afectivos utilizados en la evaluación sensorial de los ambientadores antihumedad y antitabaco, demostraron la aceptación de ambos productos.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. NC 1284, *Cosméticos. Perfumes Líquidos. Clasificación y requisitos*, La Habana, Cuba, 2019.
2. R.R. Calkin, J.S. Jellinek, *Perfumery. Practice and Principles*, John Wiley & Sons, New Delhi, India, 2014.
3. L.L.C. Phuong, D.T. Tai, N.M. Hoang, N.T.T. Tran, Formulation of essential oil-based air freshener, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **38**(4), 40-49 (2022). Doi: <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5432>
4. P.A. Lazzano-Alonso, C.E. Mora-Huertas, Efecto de las fragancias en el desempeño sensorial de productos cosméticos tipo champú, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **42**(2), 260-283 (2013). URL: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/45120/46491>
5. M.B. Johnson, R. Kingston, M.J. Utell, J.R. Wells, M. Singal, W.R. Troy, *et al.*, Exploring the science, safety and benefits of air care products: perspectives from the inaugural air care summit, *Inhalation Toxicology*, **31**(1), 12-24 (2019) Doi: <https://doi.org/10.1080/08958378.2019.1597221>
6. L. Amador, *Perfumes: Detalles Íntimos*, Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba, 2018, p. 11-24.
7. Fundación Academia del Perfume, *El limón: explosión de frescor*, España, 2020. URL: <https://www.academiadelperfume.com>, consultado 07/2022.

8. ELLE, Cómo impactan al cerebro los olores cítricos de los perfumes, España, 2023. URL: <https://www.elle.com/es/belleza/cara-cuerpo/a44670465/perfumes-frescos-citricos-emociones-cerebro/>, consultado 08/2023.
9. Pressentia, *Tipos de perfumes: Familias olfativas*, España. URL: <https://www.pressentia.com/tipos-de-perfumes/>, consultado 10/2022.
10. Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología (INHEM), *Registro sanitario de alimentos, cosméticos, juguetes y otros productos de interés sanitario. Regulaciones e indicaciones*, La Habana, Cuba, 2017.
11. R. Hutagaol, Formulation of air freshener gel with carrageenan as gelling agent, lemon oil as fragrance and patchouli oil as binder, *International Journal of ChemTech Research*, **10**(4), 207-212 (2017). URL: [https://sphinxsai.com/2017/ch_vol10_no4/1/\(207-212\)V10N4CT.pdf](https://sphinxsai.com/2017/ch_vol10_no4/1/(207-212)V10N4CT.pdf)
12. F.I. ALshaer, D.F. ALbaharna, H.O. Ahmed, M.G. Anas, J.M. ALJassmi, Qualitative analysis of air freshner spray, *Journal of Environmental and Public Health*, **2019**, ID 9316707 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1155/2019/9316707>
13. A. Bratovčić, Synthesis of gel air freshener and its stability, *Technologica Acta*, **12**(2), 15-21 (2019). Doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3643387>
14. P.K. Roy, R. Subba, N. Kalita, Remlalruali, Zonuntluangi, Laldinchhana, S.H.V. Devi, T.C. Lalhriatpuii, H. Lahlhlemawia, Effect of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in release profile of air fresheners gel prepared using carrageenan, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **79**(2), 172-175 (2023). URL: <https://globalresearchonline.net/ijpsrr/v79-2/27.pdf>
15. N.A.B.M. Hilmy, N.A.A.K. Zani, N.A. Ramli, F. Adam, M.H. Sulaiman, Evaluation of sorbitan monolaurate concentration on carrageenan gel properties, *Malaysian Journal of Chemical Engineering & Technology*, **5**(2), 166-171 (2022). Doi: <https://doi.org/10.24191/mjcet.v5i2.19764>
16. P. Williams, Fragrance stability. How to avoid problems, *COSSMA*, **3**, 22-24 (2014). URL: https://www.orchadia.org/documents/COSSMA_Stability_Article_Mar_2014.pdf
17. L. Nazario-Ladrón de Guevara, M. Fernández-Cervera, Fragancias unisex para perfume y crema humectante, *Ars Pharmaceutica*, **64**(2), 148-160 (2022). Doi: <https://doi.org/10.30827/ars.v64i2.27110>

18. IFRA Standards, *Index of IFRA Standards–49th Amendment*, 2020. URL: [https://ifrafragrance.org/docs/default-source/ifra-code-of-practice-and-standards/49th-amendment/ifra-49th-amendment-\(att-04\)---index-of-ifra-standards.pdf?sfvrsn=6269aaf4_3](https://ifrafragrance.org/docs/default-source/ifra-code-of-practice-and-standards/49th-amendment/ifra-49th-amendment-(att-04)---index-of-ifra-standards.pdf?sfvrsn=6269aaf4_3), consultado 07/2023.
19. Suchel-Fragancia, Procedimiento PSC-2. *Control del diseño y desarrollo*, La Habana, Cuba, 2016.
20. Suchel-Fragancia, Instrucción de Trabajo IT 8-7-DD-01. *Formas de fabricación para productos terminados*, La Habana, Cuba, 2016.
21. NC Guía 1324, *Guía de estabilidad de los productos cosméticos*. La Habana, Cuba, 2019.
22. NC-ISO 280, *Aceites esenciales. Determinación del índice de refracción*, La Habana, Cuba, 2003.
23. NC-ISO 279, *Aceites esenciales. Determinación de la densidad relativa*, La Habana, Cuba, 2003.
24. NC 836, *Cosméticos, agentes activos de superficie, limpiadores, desinfectantes y ambientadores. Determinación de pH*, La Habana, Cuba, 2011.
25. Suchel-Fragancia, Instrucción de Trabajo IT 8-2-AC-01, *Determinación de grado alcohólico*, La Habana, Cuba, 2013.
26. J.M. Espinoza, *Análisis Sensorial*, Editorial Universitaria Félix Varela, La Habana, Cuba, 2014.

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

A. Sánchez-Díaz, L. Nazario-Ladrón de Guevara, M. Fernández-Cervera, Ambientadores antihumedad y antitabaco: desarrollo de fragancias, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 145-163 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1111290>

Estudio de la estabilidad física, química y microbiológica de una preparación extemporánea a base de maleato de enalapril

Javier Enrique Ariza Paba^a, Bibiana Margarita Vallejo Díaz^b, Clara Eugenia Plazas Bonilla^c, Helber de Jesús Barbosa Barbosa^{d*}

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, D. C., Colombia

Correos electrónicos: ^a jearizap@unal.edu.co, ^b bmvallejod@unal.edu.co, ^c ceplazasb@unal.edu.co, ^d hdbarbosab@unal.edu.co

*Autor correspondiente.

Recibido: 30 de septiembre de 2021

Revisado: 25 de enero de 2024

Aceptado: 26 de enero de 2024

RESUMEN

Introducción: Durante el diseño y formulación de formas farmacéuticas, o en caso de alguna transformación por la necesidad de ajustar la dosis o adecuarlo al estado del paciente, es necesario verificar las características químicas, físicas y biológicas de todos los componentes que harán parte de la formulación del producto final. Lo anterior con el fin de garantizar que la preparación sea estable, eficaz, segura, fácil de administrar y bien tolerada. **Objetivo:** Estudiar las propiedades físicas y químicas de una preparación extemporánea líquida de maleato de enalapril para administración peroral, elaborada a partir de tabletas comercialmente disponibles en el mercado colombiano, haciendo uso de prácticas comunes en los centros hospitalarios para su preparación. **Materiales y métodos:** Como vehículos se utilizaron: una solución en proporción 1:1 de dextrosa en agua al 5% y agua destilada (vehículo 1) y una solución de la misma composición del vehículo 1 ajustada a pH 3,0 con ácido ascórbico (vehículo 2). Las muestras se envasaron en frascos ámbar o transparentes y se almacenaron a 5 ± 2 °C y 25 ± 2 °C durante 360 horas. El maleato de enalapril se cuantificó a las 0, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 y 360 horas, usando una metodología validada, la cual demostró ser selectiva, lineal, precisa y exacta. **Resultados:** Los resultados indican que el pH es un factor que afecta el tiempo de vida útil de las preparaciones líquidas extemporáneas de maleato de enalapril.

La estabilidad de la preparación extemporánea se conservó hasta 240 horas usando el vehículo 1 y almacenándola a una temperatura de 5 ± 2 °C en frasco ámbar.

Palabras clave: maleato de enalapril, propiedades fisicoquímicas, preparación extemporánea, estabilidad.

SUMMARY

Study of the physical, chemical and microbiological stability of an extemporaneous preparation based on enalapril maleate

Introduction: During the design and formulation of pharmaceutical forms, or in case of any transformation due to the need to adjust the dose or adapt it to the patient's condition, it is necessary to verify the chemical, physical and biological characteristics of all the components that will be part of the formulation in the final product. The above in order to ensure that the compounding it is stable, effective, safe, easy to administer and well tolerated. **Objective:** To study the physical and chemical properties of an extemporaneous (compounding) liquid preparation of enalapril maleate for peroral administration, prepared from tablets commercially available in the Colombian market, using common practices in hospital centers for its preparation. **Materials and methods:** The following were used as vehicles: a 1:1 solution of dextrose in 5% water and distilled water (vehicle 1) and a solution of the same composition of vehicle 1 adjusted to pH 3.0 with ascorbic acid (vehicle 2). Samples were packaged in amber or transparent bottles and stored at 5 ± 2 °C and 25 ± 2 °C for 360 hours. Enalapril maleate was quantified at 0, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 and 360 hours, using a validated methodology, which proved to be selective, linear, precise and exact. **Results:** The results indicate that pH is a factor that affects the shelf life of extemporaneous liquid preparations of enalapril maleate. The stability of the extemporaneous preparation was preserved up to 240 hours using vehicle 1 and storing it at a temperature of 5 ± 2 °C in an amber bottle.

Keywords: enalapril maleate, physicochemical properties, extemporaneous preparation, stability.

RESUMO

Estudo da estabilidade física, química e microbiológica de uma preparação extemporânea à base de maleato de enalapril

Introdução: Durante o desenho e formulação de formas farmacêuticas, ou em caso de qualquer transformação devido à necessidade de ajuste de dose ou adaptação à condição do paciente, é necessário verificar as características químicas, físicas e biológicas de todos os componentes que farão parte da formulação do produto final. Tudo isto para garantir que a preparação é estável, eficaz, segura, fácil de administrar e bem tolerada. **Objetivo:** Estudar as propriedades físicas e químicas de uma preparação líquida extemporânea de maleato de enalapril para administração peroral, preparada a partir de comprimidos comercialmente disponíveis no mercado colombiano, utilizando práticas comuns em centros hospitalares para sua preparação. **Materiais e métodos:** Foram utilizados como veículos: uma solução 1:1 de dextrose em 5% de água e água destilada (veículo 1) e uma solução de mesma composição do veículo 1 ajustada para pH 3,0 com ácido ascórbico (veículo 2). As amostras foram acondicionadas em frascos âmbar ou transparentes e armazenadas a $5\pm 2^\circ\text{C}$ e $25\pm 2^\circ\text{C}$ por 360 horas. O maleato de enalapril foi quantificado nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 e 360 horas, utilizando metodologia validada, que se mostrou seletiva, linear, precisa e exata. **Resultados:** Os resultados indicam que o pH é um fator que afeta o prazo de validade das preparações líquidas extemporâneas de maleato de enalapril. A estabilidade da preparação extemporânea foi preservada por até 240 horas utilizando o veículo 1 e armazenando-a à temperatura de $5\pm 2^\circ\text{C}$ em frasco âmbar.

Palavras-chave: maleato de enalapril, propriedades físico-químicas, preparação extemporânea, estabilidade.

INTRODUCCIÓN

Para realizar el diseño y formulación de formas farmacéuticas es necesario verificar las características químicas, físicas y biológicas de todos los componentes que harán parte de la formulación del producto, considerando tanto los ingredientes activos como los excipientes. Todos estos deben ser compatibles entre sí con el fin de garantizar que el producto farmacéutico sea estable, eficaz, seguro, fácil de administrar y bien tolerado.

Otro aspecto que se debe considerar durante el diseño y formulación de medicamentos es la edad del paciente: un adulto, un niño o un neonato tienen grandes diferencias

fisiológicas, por lo que las dosis de administración de un fármaco para estos pacientes suelen ser diferentes. Algunas formas farmacéuticas que se encuentran en el mercado no son muy prácticas para usarlas en niños, neonatos y personas de la tercera edad, porque han sido diseñadas para personas adultas y los requerimientos de dosis para estos pacientes varían según su peso corporal o área superficial. Además, se debe tener en cuenta que los bebés y usualmente niños menores de 5 años son incapaces de tragar o deglutir una forma farmacéutica sólida, como lo son las tabletas y cápsulas; requiriéndose para estos pacientes formas farmacéuticas líquidas en lugar de las sólidas. De esta manera una preparación líquida podría ser útil para la administración peroral de fármacos en infantes, niños y personas de la tercera edad pues sería posible ajustar la dosis del fármaco variando el volumen administrado. Sin embargo algunos fármacos no suelen ser estables por mucho tiempo en un medio líquido, situación que explica la razón por la cual estos fármacos no se encuentran comercializados en esta forma farmacéutica.

La acción más frecuente para manejar la prescripción en lactantes, en los centros hospitalarios, es realizar la trituration de una forma de dosificación disponible (tabletas, cápsulas) hasta la obtención de un polvo fino y mezclar con un líquido, quedando generalmente en forma de suspensión. En pacientes jóvenes se prefiere mezclar el polvo con alimentos líquidos para enmascarar su sabor amargo [1, 2]. Estas técnicas de administración hospitalaria pueden llevar a una imprecisión en la dosificación del fármaco administrado, teniendo además inconvenientes relacionados con el desconocimiento de la estabilidad de la preparación en los medios líquidos utilizados.

Debido a estas necesidades que se presentan en los hospitales, el farmacéutico busca elaborar una preparación extemporánea líquida, para administración peroral a partir de tabletas o cápsulas, utilizando como medio de transporte del fármaco, soluciones manejadas en el ámbito hospitalario como son: la solución salina, la solución de dextrosa entre otras, sin garantizar la estabilidad de dicha preparación. Por lo tanto, durante la transformación son parámetros a considerar: la solubilidad y estabilidad del fármaco, el pH y la composición del medio de suspensión [1].

Los fármacos en preparaciones extemporáneas líquidas pueden sufrir reacciones químicas que llevan a la degradación, entre las que se encuentran reacciones de hidrólisis, oxidación o reducción. El pH y otros factores pueden influir en la velocidad o el tipo de reacción; por ejemplo, esta degradación química generalmente aumenta con la temperatura, siendo una condición a tener en cuenta en los ensayos de estabilidad acelerada. Es importante evaluar el cambio de color, olor y pH, que pueden ser una manifestación de inestabilidad fisicoquímica y a su vez se debe observar si se presenta sedimentación de los fármacos que puedan causar dificultad en la redispersión de la formulación. Por otro lado, el crecimiento microbiano en la preparación puede causar mal olor y turbi-

dez, afectando notablemente su apariencia y estabilidad, además puede conducir a un cambio de pH de la formulación y así reducir la estabilidad química y solubilidad del fármaco como consecuencia de los subproductos del metabolismo microbiano. Esto hace que sea necesario contar con un área limpia, materias primas y envases que garanticen la estabilidad microbiológica adecuada para la preparación [3, 4].

Es así como estas propiedades físicas, químicas y microbiológicas juegan un papel fundamental en la estabilidad de la preparación extemporánea. Es importante resaltar que la estabilidad, entendida como la conservación dentro de límites especificados durante el periodo de almacenamiento y utilización de las propiedades y características que presentaba cuando se elaboró, será de días e incluso horas para el caso particular de las preparaciones extemporáneas; sin embargo, se considera un tiempo adecuado y suficiente para satisfacer las necesidades terapéuticas de un paciente que requiere de la adecuación de una forma farmacéutica, [5-8].

Por tal razón, surge el propósito del presente estudio: preparar una forma de dosificación líquida peroral extemporánea de maleato de enalapril con vehículos de fácil acceso. En pediatría el enalapril es uno de los fármacos más ampliamente utilizados en cardiología [9], se emplea para el tratamiento de la hipertensión esencial y renovascular y en la insuficiencia cardíaca congestiva [1]. En Colombia, el maleato de enalapril se encuentra disponible en tabletas de 5, 10 y 20 mg, no encontrándose suspensiones comercialmente disponibles para administración peroral que puedan ser usadas para tratar a niños o ancianos que no pueden tragar o deglutir las tabletas [10].

Aunque se han realizado estudios para asegurar la estabilidad de preparaciones extemporáneas, algunos de estos trabajos han utilizado vehículos que son comerciales y para los hospitales, especialmente aquellos de niveles I y II, no existe facilidad para su adquisición. Para garantizar que los hospitales puedan elaborar la preparación extemporánea, se han considerado como los vehículos seleccionados, aquellos de uso frecuente en estas instituciones; ya que el empleo de otros medios, aunque logren brindar estabilidad a la preparación líquida de maleato de enalapril, podrían ser de difícil acceso al ser vehículos de marcas comerciales [1, 10].

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos

Cromatógrafo Merck Hitachi modelo D-7000, con detector UV de arreglo de diodos, columna cromatográfica RP 18 de 150 × 4,6 mm y tamaño de partícula 5 µm, balanza analítica Mettler Toledo XP 205 serie 1126300620, baño de ultrasonido US-0061

Elma E 300H Elmasonic, termohigrómetro Digital Traceable VWR, baño maría Precisión Scientific modelo TS-66618 AZ-1.

Materiales

Tabletas de maleato de enalapril de 20 mg, estándar USP de maleato de enalapril, agua destilada, metanol calidad HPLC (Merck), fosfato de potasio (Merck), ácido clorhídrico (Merck), hidróxido de sodio grado reactivo (Merck), ácido ascórbico (Research Pharmaceutical S,A), ácido ortofosfórico (Merck), peróxido de hidrógeno (Merck) y dextrosa al 5% USP (Baxter).

Preparación de la suspensión extemporánea

En un mortero de porcelana con pistilo, se trituraron 20 tabletas de maleato de enalapril hasta obtener un polvo fino. De la mezcla se pesó el equivalente a 20 mg de maleato de enalapril (previa determinación de la variación de peso), la cual se llevó a un balón aforado de 200 mL y se adicionó 50 mL del vehículo seleccionado (vehículo 1: solución dextrosa 5% y agua 1:1 ó vehículo 2: solución dextrosa 5% y agua 1:1 pH ajustado a 3,0 con ácido ascórbico), se agitó vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea. Finalmente, se completó a volumen con el vehículo seleccionado, se agitó nuevamente y se envasó en frascos de plástico ámbar o transparentes con capacidad de 60 mL y tapa rosca plástica. Las preparaciones extemporáneas de maleato de enalapril fueron almacenadas a (5 ± 2) °C (nevera PHILIPS Polarix) y a (25 ± 2) °C (estufa de calentamiento IKA C-MA6-HS7).

Estandarización del método

Se desarrolló y validó la metodología para este producto teniendo como punto de partida las condiciones cromatográficas aplicadas para un estudio de estabilidad química de maleato de enalapril del Departamento de investigación de la Universidad de Concepción, Chile [11, 12]. Se modificó el método para la estandarización y optimización de las condiciones cromatográficas, con el fin de lograr parámetros cromatográficos que representaran la idoneidad del sistema para la cuantificación del principio activo en suspensión [13, 14].

Preparación de la muestra

La muestra fue obtenida mediante la trituración de 20 tabletas hasta obtener un polvo fino (de la mezcla se pesó el equivalente a 20 mg/tableta de maleato de enalapril). Una porción de 1450 mg del polvo se transfirió a un balón aforado de 200 mL, se adicionaron 50 mL del vehículo 1 y se agitó vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea, se completó volumen con el vehículo seleccionado y se agitó nuevamente. Igual procedimiento se siguió para el vehículo 2. Posteriormente, se transfirió una alícuota

de 5 mL a un balón aforado de 25 mL, se diluyó con agua, agitando vigorosamente y aforando a continuación con agua.

Selectividad

La selectividad se evaluó en relación a los excipientes y a los productos de la degradación forzada del activo. Para ello, se preparó una mezcla de los componentes de la formulación de la tableta de maleato de enalapril, pesando el doble de la cantidad en que se encuentran en la suspensión (excluyendo al principio activo) y se llevó el placebo a una concentración similar a la de las muestras durante el análisis de cuantificación del analito de interés. Tanto los excipientes que hacen parte de la matriz de las tabletas como el maleato de enalapril fueron sometidos a degradación forzada realizando pruebas de hidrólisis acuosa, ácida, básica, sometiendo las muestras a calentamiento en cada caso a una temperatura de 70 °C por 12 horas. Las degradaciones se llevaron a cabo con NaOH 0,1N, HCl 0,1N, peróxido de hidrógeno al 3% y exposición al medio ambiente por 12 horas diarias, día luz, durante cuarenta horas.

Linealidad

La linealidad del sistema y del método se determinó analizando la matriz de la suspensión enriquecida con el estándar de maleato de enalapril en concentraciones 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 y 0,30 mg/mL.

Precisión

La repetibilidad se evaluó mediante la preparación de una solución de muestra a la concentración nominal del 100% (aproximadamente 0,2 mg/mL de maleato de enalapril). La precisión intermedia se evaluó entre días y entre analistas, realizando determinaciones en dos días diferentes, por dos analistas y valorando tres réplicas por día.

Exactitud

Se determinó la exactitud de la metodología para tres niveles de concentración 0,1, 0,2 y 0,3 mg/mL, equivalentes al 50% 100% y 150% respectivamente y realizando tres réplicas para cada nivel.

Procesamiento de las muestras para análisis

La evaluación de la concentración remanente de activo de cada una de las muestras se valoró por duplicado utilizando el método por HPLC previamente validado. Para esto, antes de llevar las muestras de las preparaciones elaboradas al equipo HPLC fueron filtradas a través de membranas de 0,45 µm y posteriormente se pasaron por un filtro de jeringa hidrofílico de PTFE (politetrafluoroetileno) de 0,22 µm. El volumen restante

de las muestras (antes de filtrar) se utilizó para evaluar la estabilidad física y microbiológica. El estudio se llevó a cabo según tiempos de análisis preestablecidos de 0, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 y 360 horas, en dos lotes de una marca comercial de maleato de enalapril escogida al azar.

Evaluación de la estabilidad física

Las propiedades físicas de cada una de las muestras fueron evaluadas mediante la observación del color y olor, medición de pH en las diferentes condiciones del estudio y comparando con un blanco. El resultado fue reportado como cambio o no cambio y los valores de pH se determinaron en un pH-metro Mettler Toledo Seven Easy.

Evaluación de la estabilidad química

Para la evaluación de las propiedades químicas se realizó el análisis del porcentaje remanente de enalapril maleato encontrado en cada muestra almacenadas a $5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ en frasco ámbar o transparente, en función del tiempo para los dos lotes, cada uno con dos réplicas. Al iniciar el almacenamiento y al cabo de 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 y 360 horas, las muestras fueron evaluadas. Se tuvo en cuenta que según lo exigido por la norma el porcentaje de enalapril debe encontrarse entre 90 y 110% [8]. La determinación del tiempo de vida útil se realizó para la mejor condición y se calculó mediante un análisis de varianza para la regresión, con el cual además se comparó la diferencia estadística entre los dos lotes.

Evaluación de la estabilidad microbiológica

Para el estudio microbiológico se realizó un recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, y ausencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para el recuento de aerobios mesófilos y de mohos y levaduras se realizaron las diluciones requeridas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) teniendo en cuenta de no utilizar menos de 1 g de la muestra a ser examinada. Para aerobios mesófilos las diluciones fueron vertidas en Agar Tripticasa de Soya fundido y se incubaron por 3 días entre 30 y 35 °C y para mohos y levaduras en Agar Sabouraud y se incubaron las cajas de Petri por 3 días a 20 – 25 °C. Utilizando el contador de colonias, se realizó el recuento de las cajas y el cálculo estándar en placa. Para *S. aureus* se utilizó una caja con Agar Manitol-Salado y se incubó durante 72 horas a 30 – 35 °C; se observó la aparición de colonias típicas de *S. aureus* amarillas o blancas rodeadas por una zona amarilla, si pasado este tiempo no aparecían colonias se reportaba como ausencia de *S. aureus*. Para *Salmonella* se inoculó en placas de Agar XLD (Xilosa-Lisina –Desoxicolato) y se incubó a 30 – 35 °C durante 48 horas; la presencia de colonias bien desarrolladas de color rojo con o sin centro negro indicaba la posible presencia de *Salmonella*. Para *E. coli* se cultivó en placa de Agar MacConkey y se incubó a 30 – 35 °C, durante 72 horas; posteriormente se realizó la

observación de crecimiento o no crecimiento de *E. coli*. Para *Pseudomonas* se utilizó un Agar Cetrimide y nuevamente se incubó a 30 – 35 °C durante 18 – 72 horas; posteriormente se realizó la observación de crecimiento o no crecimiento. Las muestras cumplen con las especificaciones si no hay presencia de colonias o si las pruebas confirmatorias son negativas. El estudio microbiológico de las preparaciones extemporáneas se realizó durante 10 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sistema de idoneidad

La idoneidad del sistema cromatográfico se verificó empleando el estándar de maleato de enalapril USP a una concentración de 0,1 mg/mL con un coeficiente de variación para las áreas de 0,297%, tomando como referencia un valor de no más de 2,0% en inyecciones repetidas [8].

El factor de capacidad fue 1,46, el número de platos teóricos fue 5471 (CV 0,66%) y el factor de asimetría 1,16 (CV 1,97%). El análisis cromatográfico indica que los resultados obtenidos del coeficiente de variación para los parámetros de tiempo de retención, áreas, factor de capacidad, platos teóricos y asimetría cumplen con lo establecido por la farmacopea USP 38 [8]. Por tal razón, el sistema cromatográfico es confiable y se puede utilizar para la validación de la metodología propuesta y el análisis del producto.

Estandarización del sistema cromatográfico

Después de realizar modificaciones en las condiciones cromatográficas y siguiendo las condiciones planteadas por el Departamento de investigación de la Universidad de Concepción [12], se determinó que las condiciones cromatográficas empleadas en el estudio fueran las siguientes: columna RP 18 de 150 × 4,6 mm, tamaño de partícula 5 μm, temperatura de la columna 23 ± 2 °C, fase móvil 55% metanol 45% buffer fosfato 0,01 M ajustado con ácido fosfórico a pH 2,2, flujo de la fase móvil: 1 mL/min, volumen de inyección: 20 μL y longitud de onda de detección: 215 nm.

Contenido teórico de la preparación de la muestra. Al seguir el procedimiento de preparación de la muestra empleando como vehículo la mezcla dextrosa al 5% y agua en proporción 1:1, al igual que el vehículo 2, la concentración esperada de maleato de enalapril obtenida fue de 0,2 mg/mL.

Selectividad

El análisis cromatográfico de las muestras evaluadas permite evidenciar que ni los excipientes de la matriz ni los productos de degradación interfieren con las señales corres-

pondientes al enalapril maleato (Figura 1). Lo anterior permite concluir que el método es selectivo y facilita la cuantificación del principio activo. En los cromatogramas de la degradación del enalapril maleato sufrida en las condiciones de estrés se identifica que el pico correspondiente al enalapril maleato tiene un tiempo de retención de 3,0-3,28 y los otros picos en tiempos de retención diferentes. Bajo condiciones de hidrólisis y oxidación el enalapril se degrada en varios compuestos como la dicetopiperazina con un tiempo de retención de 5,40-5,61 y el ácido málico con un tiempo de retención aproximado de 1,0, los otros picos muy posiblemente se deban a impurezas que no han sido identificadas que aparecen con un tiempo de retención de 1,59 y 1,60 y la señal 4,2 posiblemente corresponda a la Vitamina C [15].

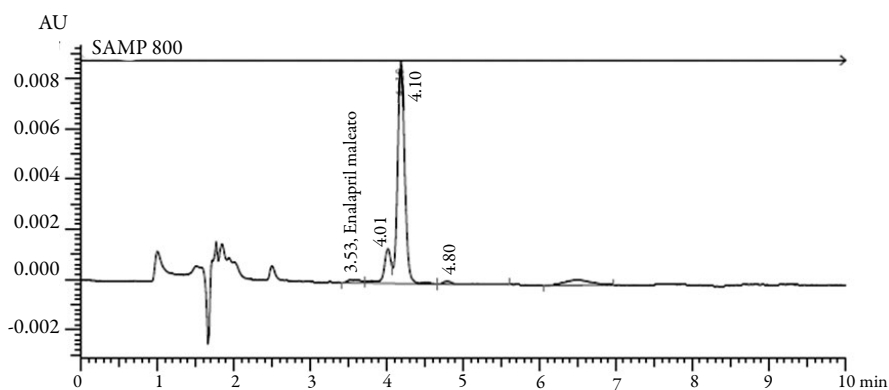


Figura 1. Selectividad frente a los excipientes.

Linealidad

Dentro de los rangos de concentración estudiados, tanto para el sistema como para el método, se obtuvo un comportamiento lineal, con un coeficiente de determinación de 0,999. Mediante la prueba *t* se determinó que los interceptos no son estadísticamente diferentes de cero y que las pendientes son estadísticamente diferentes de cero. Los resultados del análisis de varianza para la linealidad del sistema y del método, mediante las pruebas *F* y ANOVA, nos podrían indicar que estadísticamente no hay dispersión de los resultados entre réplicas para las distintas concentraciones, asimismo los *F* calculados tanto para el sistema como para el método son menores al valor del *F* de la tabla, corroborando el cumplimiento de la linealidad de la metodología (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de validación de la metodología analítica

Parámetro	Prueba estadística	Estadístico experimental	Estadístico tabulado	Concepto
Linealidad del sistema	Prueba F de Fisher	28512,406	4,670	$F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$ La regresión es significativa
Linealidad del método	Prueba F de Fisher	23936,058	4,960	$F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$ La regresión es significativa
Precisión intermedia	Prueba F de Fisher	1,336	4,387	$F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$ No existe diferencia significativa entre los resultados
Exactitud	Prueba t de Student	2,439	2,306	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$ Hay diferencia significativa entre los datos
	Prueba de Cochran	0,521	0,870	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}$ La concentración no afecta la variabilidad de los resultados

Precisión

Los coeficientes de variación obtenidos para la precisión del sistema y del método fueron 0,50% y 1,11% respectivamente, los cuales son inferiores al valor máximo aceptado para métodos cromatográficos (2%), indicando una adecuada repetibilidad para el sistema como para el método. Para la precisión intermedia del método el coeficiente de variación de las respuestas fue de 1,09%. El análisis de varianza, mediante un test F , indica que no existe diferencia significativa en los resultados por cambio de analistas o al realizar el análisis en diferentes días (Tabla 1).

Exactitud

Los porcentajes de recuperación obtenida se encontraron en un intervalo entre 100,08 y 101,92%, cumpliendo con el criterio de aceptación, donde el promedio total de los porcentajes recuperados debe estar entre el rango de 98 y 102 %, En la prueba t de Student, el valor $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$, conduce a fallar en el rechazo de la hipótesis nula H_0 y por tanto, se concluye que la probabilidad de obtener un valor t , con ocho grados de libertad, igual o mayor a 2,4398 es aproximadamente 0,005, cuando el promedio es 100,877; es decir, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos y el 100%. La prueba de Cochran indica que el nivel de concentración no afecta la variabilidad de los resultados, al ser $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$ (Tabla 1).

Propiedades físicas (estabilidad física) de las formulaciones

En todas las muestras de estudio no se observaron cambios de color ni olor de la suspensión, permaneciendo con el color y olor característicos de la muestra inicial. Asi-

mismo, la variación de pH en las diferentes condiciones de estudio no es significativa, lo que indica que químicamente es estable frente a esta condición. Sin embargo, al comparar el remanente de activo en los dos vehículos empleados, se evidencia que en el vehículo 2 el porcentaje de remanente de activo sale de los límites en un menor tiempo a comparación del vehículo 1.

Tabla 2. Datos de estabilidad utilizando el vehículo 1 (dextrosa 5% - agua 1:1).

Tiempo de muestreo (Horas)	t (°C)	N° muestra (vial (1) Ámbar y (2) Transparente)	Lote 1		Lote 2	
			% Remanente	pH	% Remanente	pH
0	5±2 °C	1	100,662	6,42	103,450	6,39
			100,950		102,965	
		2	100,662	6,42	103,450	6,39
			100,950		102,965	
	25±2 °C	1	100,662	6,42	103,450	6,39
			100,950		102,965	
		2	100,662	6,42	103,450	6,39
			100,950		102,965	
12	5±2 °C	1	101,072	6,41	100,983	6,41
			100,634		101,818	
		2	99,396	6,40	99,790	6,39
			98,402		101,824	
	25±2 °C	1	99,687	6,40	99,518	6,40
			100,982		98,819	
		2	100,100	6,41	98,669	6,39
			100,546		98,861	
24	5±2 °C	1	99,055	6,39	101,235	6,40
			98,674		101,235	
		2	98,097	6,42	99,753	6,40
			99,975		100,800	
	25±2 °C	1	100,096	6,38	99,593	6,39
			99,994		99,083	
		2	97,780	6,41	100,924	6,41
			99,028		100,691	
36	5±2 °C	1	100,595	6,38	101,393	6,40
			100,224		100,299	
		2	100,290	6,37	101,055	6,43
			99,545		99,313	
	25±2 °C	1	99,485	6,41	101,154	6,40
			99,531		102,059	
		2	100,317	6,42	100,365	6,37
			99,219		101,250	

(Continúa)

Tiempo de muestreo (Horas)	t (°C)	N° muestra (vial (1) Ámbar y (2) Transparente)	Lote 1		Lote 2	
			% Remanente	pH	% Remanente	pH
48	5±2 °C	1	100,131	6,40	99,237	6,41
			97,383		99,675	
		2	99,422	6,34	98,307	6,36
			100,013		98,307	
	25±2 °C	1	99,954	6,39	101,630	6,38
			99,365		98,730	
		2	99,458	6,40	99,176	6,40
			98,198		99,176	
72	5±2 °C	1	101,759	6,38	100,096	6,42
			100,797		100,995	
		2	100,529	6,36	100,040	6,36
			99,608		99,892	
	25±2 °C	1	100,686	6,34	100,714	6,34
			100,686		100,115	
		2	100,430	6,37	100,183	6,41
			100,430		100,020	
120	5±2 °C	1	97,765	6,37	98,854	6,42
			97,865		98,676	
		2	99,862	6,40	99,625	6,38
			99,210		99,634	
	25±2 °C	1	97,765	6,37	99,114	6,34
			97,865		98,372	
		2	98,346	6,35	98,356	6,36
			97,429		98,820	
168	5±2 °C	1	96,441	6,39	95,763	6,38
			97,052		96,591	
		2	96,451	6,32	97,097	6,37
			97,896		97,149	
	25±2 °C	1	96,019	6,40	95,062	6,37
			96,032		96,654	
		2	94,764	6,38	95,143	6,39
			94,408		95,120	
240	5±2 °C	1	90,197	6,36	91,038	6,32
			90,774		90,517	
		2	90,881	6,38	90,057	6,36
			91,116		89,556	
	25±2 °C	1	90,197	6,32	88,366	6,35
			90,774		88,940	
		2	90,008	6,34	89,092	6,38
			90,729		89,146	

(Continúa)

Tiempo de muestreo (Horas)	t (°C)	N° muestra (vial (1) Ámbar y (2) Transparente)	Lote 1		Lote 2	
			% Remanente	pH	% Remanente	pH
360	5±2 °C	1	90,604	6,28	89,335	6,28
			89,760		90,035	
		2	89,395	6,30	89,049	6,34
			90,379		90,155	
	25±2 °C	1	89,177	6,30	89,477	6,27
			89,285		88,215	
		2	89,686	6,28	90,008	6,25
			90,246		90,078	

Tabla 3. Datos de estabilidad utilizando el vehículo 2 (dextrosa 5% - agua 1:1, pH 3,0),

Tiempo de muestreo (Horas)	t (°C)	N° muestra (vial (1) Ambar y (2) Transparente)	Lote 1		Lote 2	
			% Remanente	pH	% Remanente	pH
0	5±2 °C	1	101,740	3,05	101,111	3,02
			101,510		102,796	
		2	101,740	3,05	101,111	3,02
			101,510		102,796	
	25±2 °C	1	101,740	3,05	101,111	3,02
			101,510		102,796	
		2	101,740	3,05	101,111	3,02
			101,510		102,796	
12	5±2 °C	1	98,737	3,05	100,961	3,04
			98,982		100,120	
		2	97,928	3,03	99,616	3,02
			98,144		99,427	
	25±2 °C	1	97,949	3,05	98,345	3,02
			99,484		99,329	
		2	98,380	3,04	98,276	3,02
			98,695		100,647	
24	5±2 °C	1	92,947	3,02	98,567	3,01
			93,304		97,586	
		2	92,247	3,04	96,542	3,00
			91,993		97,344	
	25±2 °C	1	91,629	3,01	97,216	3,02
			91,125		95,133	
		2	97,073	3,05	96,400	2,99
			96,205		95,097	

(Continúa)

Tiempo de muestreo (Horas)	t (°C)	N° muestra (vial (1) Ambar y (2) Transparente)	Lote 1		Lote 2	
			% Remanente	pH	% Remanente	pH
36	5±2 °C	1	88,562	3,05	94,594	3,03
			86,986		94,594	
		2	91,064	3,04	94,599	3,02
			89,167		93,231	
	25±2 °C	1	92,548	3,02	94,935	3,01
			89,647		94,935	
		2	92,730	3,04	96,229	3,02
			91,714		94,318	

Estabilidad química de las formulaciones

Respecto a la variación de la concentración de enalapril maleato se observa que la suspensión envasada en frasco ámbar o transparente estudiadas a 5±2 °C o 25±2 °C y utilizando el vehículo 1 (tabla 2) en las primeras 240 horas, no presentó variación de la concentración del activo; los valores de la cantidad remanente se encuentran dentro del porcentaje del 90 al 110% exigido por la norma, lo que indica que químicamente hasta este tiempo es estable. A partir de las 240 horas se presenta una disminución del porcentaje, alcanzando el 89,335%. Estadísticamente su diferencia no es significativa, pero no cumpliría la norma del porcentaje de la cantidad remanente, indicando que se empieza a mostrar una posible influencia de la condición de exposición o del vehículo de la preparación. Respecto al pH de la suspensión utilizando el vehículo 1 se observa que su variación no es significativa durante el tiempo ni en las condiciones del estudio; encontrándose un valor promedio de pH de 6,37 para las preparaciones.

La preparación con el vehículo 2 ajustado a pH 3,0 tienen un tiempo máximo de estabilidad de 24 horas envasada en frasco ámbar o transparente y estudiada a 5±2 °C o 25±2 °C y la cantidad del activo se encuentra dentro de los límites permitidos. A partir de este tiempo disminuye la cantidad remanente del enalapril maleato y posiblemente se debe al pH que acelera los procesos degradativos, estando de acuerdo con lo reportado en la literatura [12], que en medio ácido y específicamente en pH de 4,6 a 4,8 la preparación es más estable. Pero a valores de pH menores a 4 se acelera la degradación con la formación del enalapril dicetopiperazina con un porcentaje cercano al 17 %

Estabilidad microbiológica de las formulaciones

Durante los diez días (240 horas) del estudio microbiológico de las muestras (tabla 4), se evidenció que las preparaciones extemporáneas cumplen con las especificaciones de recuento microbiológico, lo cual indica las buenas condiciones de limpieza e higiene en la elaboración y envase y que deben ser consideradas en el protocolo de elaboración.

Tabla 4. Resultados estudio microbiológico

Prueba	Especificaciones	Resultados
Recuento de aerobios mesófilos	Máx, 1000 UFC/g	Menor a 10 UFC/g
Recuento de mohos y levaduras	Máx, 1000 UFC/g	Menor a 10 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausentes	Cumple
<i>Salmonella</i>	Ausentes	Cumple
<i>Escherichia coli</i>	Ausentes	Cumple
<i>Pseudomonas</i>	Ausentes	Cumple

Determinación del tiempo de vida útil de la preparación extemporánea

Teniendo en cuenta que la preparación extemporánea presenta una mayor estabilidad en el vehículo 1 (dextrosa al 5% - agua 1:1), bajo la condición de temperatura de 5 ± 2 °C y almacenada en frasco transparente, se utilizaron los datos de porcentaje remanente de activo de esta condición (tabla 2) para determinar el tiempo de vida útil de la preparación extemporánea. Se realizó el análisis de regresión lineal para los lotes uno y dos. El tratamiento estadístico realizado indica que no existen diferencias significativas entre los lotes 1 y 2 (tabla 5), ya que los valores de los F calculados son menores que los F de la tabla, por lo cual se acepta la hipótesis nula. Los resultados obtenidos permiten combinar los datos de ambos lotes para estimar la degradación de la preparación extemporánea en la condición de estudio establecido para la muestra.

Tabla 5. Resumen tratamiento estadístico determinación del tiempo de vida útil vehículo dextrosa 5% - agua 1:1, frasco transparente, 5 ± 2 °C.

Comparación entre lotes	SCR			
Lote 1	46,78688541			
Lote 2	70,25090841			
Lote 1+2	120,1328406			
Comparación	gln	gld	F calculado	F tabla ($\alpha=0,05$)
Modelos	2	36	0,476007288	3,232
Pendientes	1	36	0,952014575	4,085
Interceptos	1	37	0,978459424	4,085

Ho: L1=L2
Se acepta Ho

gln: grados de libertad del numerador, gld: grados de libertad del denominador

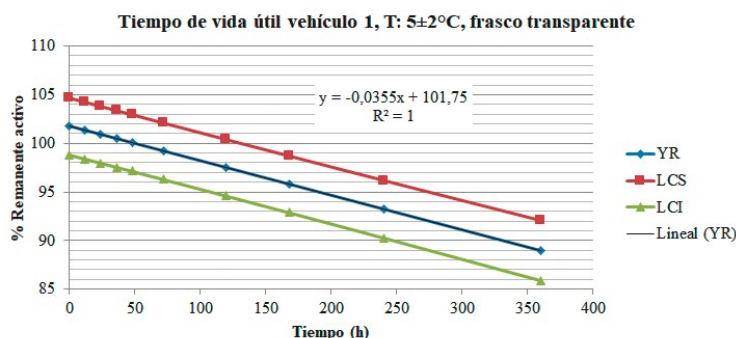


Figura 2. Tiempo de vida útil vehículo dextrosa 5% - agua 1:1, frasco transparente, 5±2°C.

En la gráfica para la determinación de la vida útil de la preparación extemporánea (Figura 2) se observa una pendiente negativa, lo que indica la degradación del activo en función del tiempo bajo la condición de estudio. Tomando como límite de confianza el 90% de la concentración de activo (remanente) se logra determinar que en un tiempo menor a 250 horas la preparación extemporánea cumple lo establecido por la norma respecto a la cantidad de activo, lo cual garantiza una respuesta terapéutica por parte del enalapril maleato.

CONCLUSIONES

Los resultados de la validación de la metodología por HPLC muestran que es selectiva, lineal, precisa y exacta, por lo tanto es confiable para ser utilizada en la cuantificación del activo enalapril maleato presente en esta preparación extemporánea.

El estudio de estabilidad realizado indica que la preparación extemporánea de enalapril maleato elaborada con el vehículo 1 (dextrosa al 5% - agua en mezcla 1:1) es químicamente más estable durante un tiempo de 240 horas, almacenada a una temperatura de 5±2 °C y 25±2 °C en frasco transparente o ámbar. Además, no se observaron cambios significativos de pH, olor y color que puedan afectar la estabilidad de la suspensión en el tiempo de estudio. La preparación elaborada con el vehículo 2 (dextrosa al 5% - agua 1:1 y ajustada a pH 3,0) es más susceptible a la degradación, lo que indica que no es recomendable utilizar este vehículo en la elaboración de la preparación extemporánea.

Como resultado de la investigación se estableció el protocolo para la preparación extemporánea que garantiza su estabilidad durante 10 días siempre y cuando se almacene a una temperatura de 5±2 °C. Este corresponde a tomar 5 tabletas de enalapril

maleato con un contenido de 10 mg por tableta, triturar hasta polvo fino y adicionar 25 mL de solución de dextrosa al 5% y 25 mL de agua destilada, obteniendo una suspensión en concentración del activo de 1 mg/mL, envasar en frasco ámbar de 60 mL con tapa rosca, etiquetar correctamente y dosificar según recomendación médica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Nacional de Colombia, la Universidad del Atlántico y al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Laboratorios Procaps Barranquilla, por facilitar los equipos y las instalaciones necesarias para el desarrollo de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. K. Sosnowska, K. Winnicka, A. Czajkowska-Kośnik, Stability of extemporaneous enalapril maleate suspensions for pediatric use prepared from commercially available tablets, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **66**(3), 321–326 (2009). URL: https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2009/3/321.pdf
2. D.J. Woods, Extemporaneous formulations - Problems and solutions, *Paediatric and Perinatal Drug Therapy*, **1**, 25-29 (1997).
3. E.H. Nieto-Mejía, *Estudio de estabilidad física y química de una preparación extemporánea de sildenafil citrato para uso pediátrico*, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., 2014. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/51507/192575.11-2014.pdf?sequence=1>
4. J.E. Ariza-Paba, *Estudios de estabilidad física y química de una preparación extemporánea de enalapril maleato para uso hospitalario*, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., 2013. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/60077/8713686.2013.pdf?sequence=1>
5. S.P. Denyer, N. Hodges, S.P. Gorman, B. Gilmore (editors), *Hugo & Russell's Pharmaceutical Microbiology*, 8th ed., Wiley-Blackwell, Hoboken (NJ), 2011.

6. E.Y. Machado-Mercado, *Estudio de estabilidad física y química de una preparación líquida extemporánea elaborada a partir de clindamicina cápsulas*, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., 2014. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/74934/emilseyolimamachadomercado.2014.pdf>
7. K.L. Maldonado-Julio, *Estudio de estabilidad física y química de una preparación extemporánea elaborada a partir de tabletas de espirolactona, para uso pediátrico*, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., 2014. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/51331>
8. USP38-NF33, Tomo 1, *Farmacopea de los Estados Unidos de América*, Rockville (MD), 2015.
9. K. Momma, ACE Inhibitors in Pediatric Patients with Heart Failure, *Pediatric Drugs*, **8**(1), 55-69 (2006). Doi: <https://doi.org/10.2165/00148581-200608010-00005>
10. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), Sistema de trámites en línea consultas públicas, Bogotá D. C., 2017. URL: https://consultaregistro.invima.gov.co/Consultas/consultas/consreg_encabcum.jsp
11. USP 35-NF 30, *Farmacopea de los Estados Unidos de América*, Rockville (MD), 2012.
12. M.d. Diego, G. Godoy, S. Mennickent, R. Godoy, Chemical stability of enalapril maleate drug substance and tablets by a stability-indicating liquid chromatographic method, *Química Nova*, **34**(3), 450-454 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000300016>
13. T. Marquez-Conde, I. Corrales-Álvarez, M. Gil-Apan, L. Martínez-Álvarez, Obtención de enalapril dicetopiperacino como sustancia de referencia, *Latin American Journal of Pharmacy*, **26**(1), 130-133 (2007). URL: http://www.lata-mjpharm.org/trabajos/26/1/LAJOP_26_1_3_6_TIIYELY8X5.pdf
14. B. Stanisz, Kinetics of degradation of enalapril maleate in dosage forms, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, **61**(6), 415-418 (2004). URL: https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2004/6/415.pdf
15. S. Bhardwaj, P.S. Sing, Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **46**(1), 113-120 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.09.014>

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

J.E. Ariza-Paba, B.M. Vallejo-Díaz, C.E. Plazas-Bonilla, H.d.J. Barbosa-Barbosa, Estudio de la estabilidad física, química y microbiológica de una preparación extemporánea a base de maleato de enalapril, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 164-183 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.112980>

Organic salts as a tool for pharmaceutical ingredient purification: Bibliographic review

Juan Carlos Ortiz Lara

Sintenovo, S.A. de C.V. Calle 13 Este n° 3 62578 Civac, Jiutepec, Estado de Morelos, México.

E-mail: jcortiz@sintenovo.com.mx

Received: October 12, 2023

Corrected: January 31, 2024

Accepted: January 31, 2024

SUMMARY

Introduction: Medicines aims to improve the health of the population; for this reason, pharmaceutical ingredients with a high purity level are necessary. In this context, the impurity content is one of the premises in the manufacture of the pharmaceutical ingredients; to comply with this parameter several unit operations can be implemented. In this regard, the pharmaceutical salts can be used as an alternative in the purification process to generate pharmaceutical ingredients with a high purity.

Purpose: This review will discuss in first instance, the importance of the impurities in the regulated environment (known, unknown impurities, genotoxic, residual solvents, and elemental impurities). Continuing with the basis of the pharmaceutical salts including functional groups that can form salts, basis of generation and hydrolysis and the main characteristic: the change in the solubility properties due to the formation of the ionic bond. This part also includes general references of previous works and compilations. The next part involves two methodological approaches to purify pharmaceutical ingredients. The first approach is based in salt formation extractions followed by salt hydrolysis. The second tactic is based on salt formation and the solubility properties. **Results:** Some examples will demonstrate the advantages of these tools. One interesting input is the compilation of several synthetic method to form salts, including examples and alternatives for sensitives cases (water, solid form, ion interchange, etc.). Finally, the salt structure determination will be commented on including the main characterization methodologies.

Keywords: Pharmaceutical salts, impurity content, salt formation, salt hydrolysis, purification, extractions, solubility change, synthesis.

RESUMEN

Sales orgánicas como herramienta para la purificación de ingredientes farmacéuticos: revisión bibliográfica

Introducción: Los medicamentos tienen como objetivo mejorar la salud de la población; por este motivo, son necesarios ingredientes farmacéuticos con un alto nivel de pureza. En este contexto, el contenido de impurezas es una de las premisas en la fabricación de los ingredientes farmacéuticos; para cumplir con este parámetro se pueden implementar varias operaciones unitarias. **Objetivo:** En este sentido, las sales farmacéuticas se pueden utilizar como una alternativa en el proceso de purificación para generar ingredientes farmacéuticos con una alta pureza. Esta revisión discutirá en primera instancia la importancia de las impurezas en el ambiente regulado (impurezas conocidas, desconocidas, genotóxicas, solventes residuales e impurezas elementales). Continuando con la base de las sales farmacéuticas incluyendo los grupos funcionales que pueden formar sales, base de generación e hidrólisis y la característica principal: el cambio en las propiedades de solubilidad debido a la formación del enlace iónico. Esta parte también incluye referencias generales de trabajos y compilaciones anteriores. La siguiente parte involucra dos enfoques metodológicos para purificar ingredientes farmacéuticos. El primer enfoque se basa en extracciones de formación de sales seguidas de hidrólisis de sales. La segunda táctica se basa en la formación de sales y las propiedades de solubilidad. **Resultados:** Algunos ejemplos demostrarán las ventajas de estas herramientas. Un aporte interesante es la recopilación de varios métodos sintéticos para formar sales, incluyendo ejemplos y alternativas para casos sensibles (agua, forma sólida, intercambio iónico, etc.). Finalmente, se comentará la determinación de la estructura de la sal incluyendo las principales metodologías de caracterización.

Palabras Clave: Sales farmacéuticas, contenido de impurezas, formación de sales, hidrólisis de sales, purificación, extracciones, cambio de solubilidad, síntesis.

RESUMO

Sais orgânicos como ferramenta para purificação de ingredientes farmacêuticos: revisão bibliográfica

Introdução: Os medicamentos visam melhorar a saúde da população; por esta razão, são necessários ingredientes farmacêuticos com alto nível de pureza. Neste

contexto, o teor de impurezas é uma das premissas na fabricação dos insumos farmacêuticos; para cumprir este parâmetro diversas operações unitárias podem ser implementadas. Nesse sentido, os sais farmacêuticos podem ser utilizados como alternativa no processo de purificação para gerar ingredientes farmacêuticos com alta pureza. **Objetivo:** Esta revisão discutirá, em primeira instância, a importância das impurezas no ambiente regulamentado (impurezas conhecidas, desconhecidas, genotóxicas, solventes residuais e impurezas elementares). Continuando com a base dos sais farmacêuticos incluindo grupos funcionais que podem formar sais, base de geração e hidrólise e a principal característica: a alteração nas propriedades de solubilidade devido à formação da ligação iônica. Esta parte também inclui referências gerais de trabalhos e compilações anteriores. A próxima parte envolve duas abordagens metodológicas para purificar ingredientes farmacêuticos. A primeira abordagem é baseada em extrações de formação de sal seguidas de hidrólise de sal. A segunda tática é baseada na formação de sal e nas propriedades de solubilidade. Alguns exemplos demonstrarão as vantagens destas ferramentas. **Resultados:** Uma contribuição interessante é a compilação de diversos métodos sintéticos para formação de sais, incluindo exemplos e alternativas para casos sensíveis (água, forma sólida, intercâmbio iônico, etc.). Por fim, será comentada a determinação da estrutura do sal incluindo as principais metodologias de caracterização.

Palavras-Chave: Sais farmacêuticos, teor de impurezas, formação de sal, hidrólise de sal, purificação, extrações, alteração de solubilidade, síntese.

INTRODUCTION

Medicine aims to improve the health of the population. Important data about the medicines is that most of 50 % of the active pharmaceutical ingredients (API) are sold as salts [1]. In this regard, the main objective of the use of a salt in an active substance is providing better absorption of the pharmaceutical ingredient contrasted with the parent drug. However, a less well-known application is the purification impact of pharmaceutical salts to improve the content of impurities in a pharmaceutical ingredient or intermediate. This alternative is not very known probably since this unit operation is poorly described in several reported procedures (mainly in patents). Nevertheless, it is a current synthetic step in the industrial manufacture of pharmaceutical ingredients to purify active substances. In this tessitura, the impurity content is one of the most important parameters evaluated in the pharmaceutical ingredients. Several byproducts are assessed as a routinely part of the analysis of the pharmaceutical ingredients. In this context the ICHQ3A defines an impurity as any component of the new drug subs-

tance that is not the chemical entity defined as a drug substance [2]. In the same guideline the impurity content in a pharmaceutical ingredient is limited to 0.10 % for the unknown impurities and 0.15 % for the known impurities. Concerning the genotoxic impurities, the limits are more restrictive (ICHM7) [3]. In addition to this, the residual solvents are *persé* considered as impurities and their content is limited by the ICHQ3C [4]. Finally, elemental impurities are assessed and limited by the ICHQ3D [5]. The reviewed approaches described in this compilation will be focused on the elimination of the organic impurities because the genotoxic, residual solvent and elemental impurities in general are eliminated and evaluated following other specific approaches.

To obtain active substances with a pharmaceutical degree (less than 0.10 % of unknown impurities and 0.15 % of known impurities) different unit operations have been developed. The first approach used is the improvement of the reaction conditions; this fact has as a consequence the control of the impurity generation *in situ* [6]. A second approach is establishing adequate quench conditions, maintaining ranges and avoiding excursions [7]. Other unit operations currently used as purification methods are: crystallizations, distillations, precipitations, solvent exchange, extractions, filtrations, seeding, charcoal treatment, pH control, use of scavengers and salt formation or hydrolysis. The last operation is a powerful tool to achieve pharmaceutical purity degrees in active substances. This review will be focused on the pharmaceutical salts, their use and application as a purification process. In addition, a perspective of their synthesis and structure determination will be mentioned.

BASIC CONCEPTS

The solubility of a drug in aqueous systems is one of the characteristics required in the development of drug substances, because many of the new drugs are insoluble in water and this fact is not adequate for the absorption in the human body. Although there are several pharmaceutical advances to improve the solubility of a drug [8], the modifications using the salt formation approach is a rapid alternative to change the solubility properties without affecting the therapeutic effect. Historically, in 1950 Nelson demonstrated that several weak acids were absorbed better than the corresponding drug parents under a gastrointestinal pH [9], that fact attracted the attention of the industry and the academy and in consequence several reviews have been written about this topic [10-18]. But what it is an organic salt? In this context, a salt is defined as a multicomponent system where protons are transferred from an acid to a base in an ionic state [19]. This fact is possible because many of the approved drug substances have functional groups like weak acids or weak bases and this characteristic could be used for the preparation of pharmaceutical salts. Between the weak acid groups that

can be mentioned are carboxylic acids, sulfonic acids, sulfonamides, phenols, etc. On the other side, the weak bases can be aliphatic, cyclic, and aromatic amines, aminopyridines, etc. These types of molecules are shown in the Figure 1 (own creation).

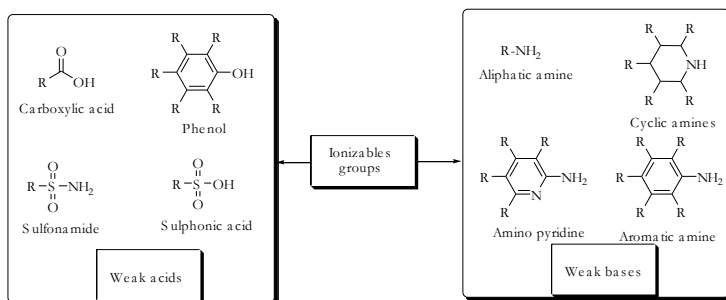


Figure 1. Functional groups that can form organic salts.

With the purpose of manufacturing an organic salt, it is necessary that the molecule comply with two requisites. First, the molecule needs to have ionizable groups and secondly, a compatible counterion it is necessary. Follow this idea, there are two possibilities for the salt formation: *i*) a pharmaceutical ingredient or intermediate with an acid (ionizable group) that reacts with a basic substance (counterion: organic or inorganic) (figure 2, figure a; own creation), and *ii*) a pharmaceutical ingredient or intermediate containing a basic ionizable group which can react with an acid substance (counterion: organic or inorganic) (figure 2, figure b; own creation).

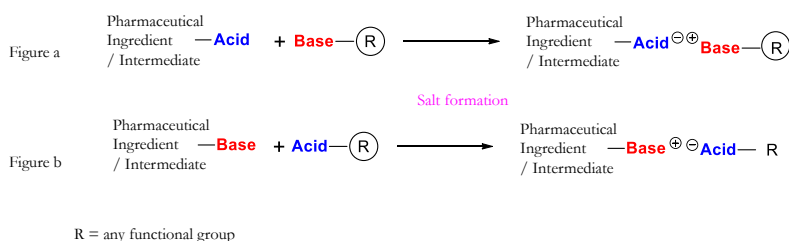


Figure 2. Typical reaction of salt formation.

In relation to stability, theoretically it is necessary a minimum difference of two or three units of pKa between the free base and the counterion to get a stable salt [20].

About the reactivity, the salt formation is a reversible reaction, so it is possible to prepare a salt and then purify the product (filtering, washing the cake, drying, etc.). After

these unit operations, the main compound could be recovered by salt hydrolysis. This fact is the main advantage of this methodology, and it is very useful to develop purification processes.

Regarding the solubility, in general for the neutral organic component (free acid or base) the solubility in organic solvents is preferred instead of the water [21]. In the opposite side, once the salt is formed the affinity for water is increased because an ionic bond is formed and in consequence the affinity for organic solvent is diminished (figure 3; own creation). This intrinsic behavior can be used to develop specific purifications to obtain pharmaceutical grades (high purity) in active substances or intermediates. It is necessary to point out that in some cases the solubility is affected by the ratio of hydrocarbon atoms presents in the parent molecule; this fact could affect the affinity for the organic solvent even if the molecule is an organic salt.

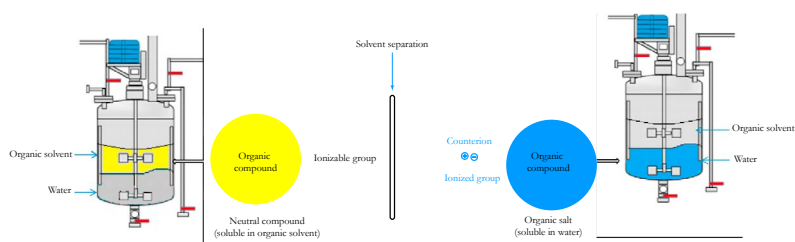


Figure 3. General solubility behavior of an organic salt.

After carrying out the purification methodology, the organic salt can be hydrolyzed using an organic or inorganic reagent with the opposite nature to the counterion and it is possible to recover the neutral compound. Both possibilities are represented in the figure 4 (own creation).

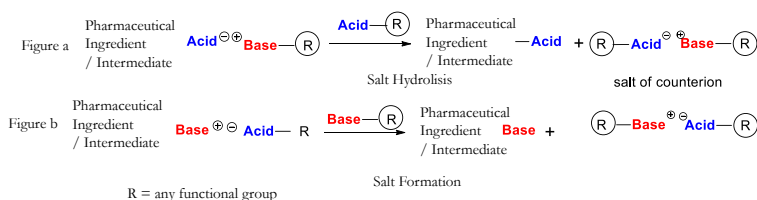


Figure 4. Typical scheme of salt hydrolysis.

Vis-à-vis of the counterions, it is possible to use different type of molecules to prepare pharmaceutical salts, in this context and from a biological point of view for pharmaceu-

tical ingredients Pfankuch *et al* had divided the counterions in three categories [22]: *i*) First class: the salt formers which are physiologically ubiquitous ions or that occurs as metabolites in biochemical pathways including the hydrochloride and sodium salts. Their use is considered unrestricted. *ii*) Second class of salt formers: those that are not naturally occurring but that have found common application and have not shown significant or tolerability issues, for example sulfonic acids. In this context Elder *et al.* [23] recently reported a review showing the advantages of sulfonic acids as counter ions. In the same line, Snodin reported an article about the regulation of alkyl sulfonates in sulfonic salts which is a very important concern in the use of this kind of counterions [24]. *iii*) Third class: These salt formers which are used in special circumstances to solve a particular problem. They are not naturally occurring in common use.

In the figure 5 (own creation), some examples of salt formers are shown. On the other hand, Paulekuhn *et al.* have reported the counterion trends for the manufacture of salts until 2007 [25]. Also usable as a counterion are the generally recognized as safe (GRAS) molecules [26]. In this context, in 2011 Tilborg *et al.* reported a review about the amino acids used as counterions. Amino acids are attractive counterions because; they are GRAS molecules that have interesting solubility properties. In this review several examples of amino acids used as counterions in active pharmaceutical ingredients are shown [27]. On the other hand in 2013, Saal and Becker reported a summary on doses of salt former from the Orange book [28]. One important information extracted from this report is that the first choice in the use of counterions are the hydrochlorides and sodium salts. However, in the synthesis of intermediates theoretically there are no restrictions and even lithium can be used as a counterion although there is not the case for a final active pharmaceutical ingredient (API) in which case a different counterion is previously established. Recently, Bharate reported a compilation about the FDA approved carboxylic acids used as counterions in Pharmaceutical salts from 1939 until 2020. In this review the technical advantages of using carboxylates over other counterions are discussed. The most useful carboxylic acids in salts are: acetate, maleate, tartrate, fumarate and succinate [29].

From a physicochemical and biological point of view, Gupta *et al* recently have published a review of pharmaceutical salts. This article describes succinctly the use of pharmaceutical salts in the preparation of pharmaceutical dosage forms [30]. Finally, Fujinuma *et al.* have described the triboelectric effect in a salt series and their respective counterions [31], this effect is very important in the commercial manufacture of actives substances in which hundreds of kilograms of final product are manufactured.

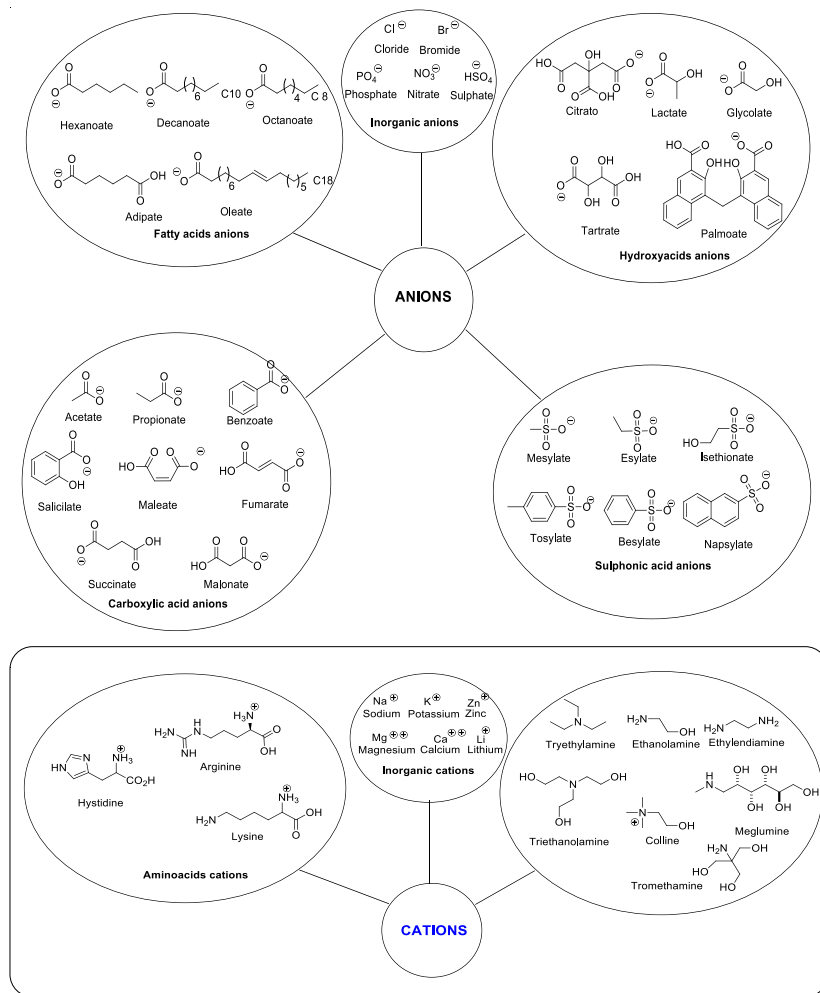


Figure 5. Some examples of counterions.

In general, the best choice for the purification of a molecule is applying the salt formation methodology using the simplest, accessible, and non-expensive reagent. For example, aqueous sodium hydroxide and hydrochloric acid are the first options. Two additional advantages are that the byproducts generated are easy to eliminate and the reagents have a low cost.

On the other hand, if the final product is salt, other criteria must be taken into account. For instance, solubility, crystallinity, toxicity, hygroscopicity, polymorphism and

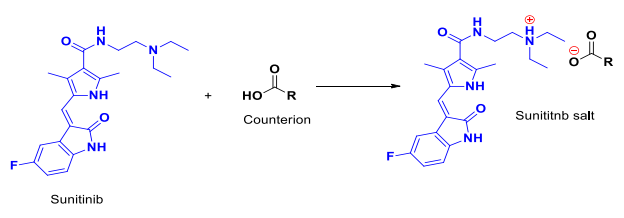
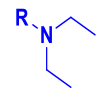
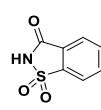
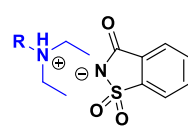
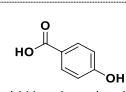
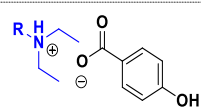
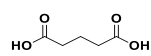
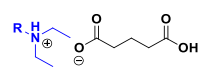
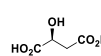
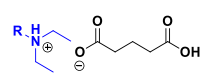
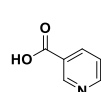
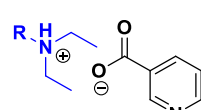
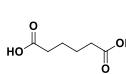
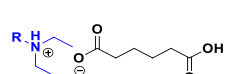
manufacturability, etc... It is important to remark that if the molecule does not have ionizable groups is not possible to form salts, for this kind of molecules is necessary other approaches (cocrystals or polymorphs, etc.).

The main impact of the transformation of an organic compound by a salt is the solubility modification; this fact generates a sudden and radical change in the affinity for other solvent. An example that demonstrated the improvement of the solubility using salts in a pharmaceutical ingredient has been reported for the Sunitinib (antineoplastic). This drug substance is known to be a poorly soluble drug, such as the solubility of this API is 0.048 mg/mL in deionized water while the marketed Malate salt has a solubility of 25 mg/mL. In this study several examples of Sunitinib salts were prepared and their solubility was evaluated [32]. The data (Table 1) showed that the use of Adipic acid dramatically increased the solubility in deionized water and demonstrated the impact of the counterion in the solubility properties. The solubility in deionized water is improved until 272 mg/mL, this data is almost eleven times the solubility of the marketed salt and 5667 times *vis a vis* of the free base. This change in the solubility could suppose “like to work with other molecule with different physical properties”. This modification in the solubility properties make it possible to develop purification strategies using this procedure because it can use a mixture of solvents to eliminate in a specific way the contaminants from the product (active ingredient or intermediate).

Salts as a purification method in the synthesis of pharmaceutical ingredients and intermediates

When a pharmaceutical ingredient is manufactured, it must comply with a specification including some parameters like titration, residual solvents, water content, and identity, among others. In this tessitura, the impurity profile is one of the most important parameters to get a safe pharmaceutical active substance because the impurities do not have therapeutic effect. Although sometimes the use of chromatographic purification methods is affordable, not always it is possible to apply this type of technology in a commercial way, mainly due to the complexity of the facilities and the high cost. Moreover, the solubility changes furnished by an organic salt represent one important alternative to achieve this task. One example of purification via salt formation / salt hydrolysis has been reported by Ley and Yates in 2008 [33]. In this work it was demonstrated that the purification methodology of the 2,4-dichloro-benzoic acid using α -methylbenzylamine to furnish the corresponding salt and then hydrolyzing them. The goal of this study was to purify the 2,4-dichloro-benzoic acid from some isomers with a higher content than 0.5 % and after the purification process the content was less than 0.05 %. The main advantages of this procedure were: *i*) to procure a product with a high quality, *ii*) be reproducible, *iii*) low cost of the starting materials, and *iv*) easiness of the process.

Table 1. Solubility of different salts of Sunitinib reported by Sangwan *et al.* [32]

 Sunitinib Counterion Sunitinib salt				
Entry	Salt former	Structure:	Solubility (mg/mL in deionized water)	Solubility ratio versus the Drug Parent
a	None (Parent drug)		Approx. 0.048 (Parent drug reference data)	1
b	 Saccharin		2	42
c	 4-hydroxybenzoic acid		3.4	71
d	 Glutaric acid		6.2	129
e	 Malic acid		25 (Marketed salt)	520
f	 Nicotinic acid		162	3375
g	 Adipic acid		272	5667

The summary of the purification process from Ley *et al.* is depicted in the figure 6.

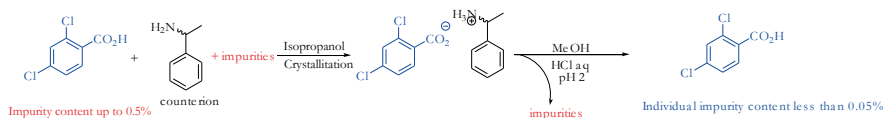


Figure 6. Purification of 2,4-dichloro-benzoic acid via salt formation-hydrolysis reported by Ley and Yates [33].

In the same way, in 2011 Anson and coworkers reported the use of this methodology for the purification of the first synthetic step in the synthesis of the one S1P1 agonist [34].

For a neophyte it could be a trivial procedure, but the perspective could change if it is necessary to purify several tons of an organic compound in a productive Plant. Furthermore, the salt preparation or hydrolysis is a unit operation largely used in the manufacture of pharmaceutical ingredients and intermediates.

As it was pointed out previously, in our context the main property of salts is the different solubility versus the free base, this property is applied in two approaches which are used in the synthesis of pharmaceutical ingredients to obtain good impurity profiles. The first approach is: salt formation, followed by extractions and salt hydrolysis. In a second instance with the aim to recover the product other unit operations can be applied. For example: salt hydrolysis, crystallization or precipitation, filtration and drying of the product. Normally in this case the free base is obtained as a final product. The second approach is: salt formation followed by crystallization. In this case the solid is isolated by crystallization or precipitation. In this case usually a salt is obtained.

Both approaches are shown in Fig. 7 (own creation).

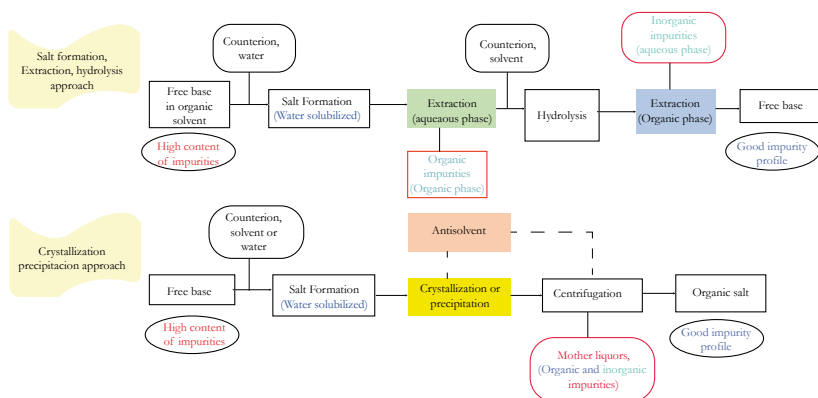


Figure 7. Purification approaches with salts.

Salts formation, extractions, salt hydrolysis

During the synthesis of an intermediate or pharmaceutical ingredient, in only a few cases the starting material is transformed to a product in a quantitative yield. In general, in the process a percentage of byproducts are generated and mixed with the product. For this reason, it is necessary to purify the procured intermediate. In many cases a chromatographic purification is not affordable at an industrial level. The alternative tool to eliminate impurities is the salt formation or salt hydrolysis. This approach is based on the solubility differences between a salt versus the neutral compound. This methodology works as follows: A reaction is started and monitored and after reaching the desired transformation (in process-control, etc.), the reaction mixture must be quenched. At that point, the compounds in the reactor are: *i*) product (with ionizable group), *ii*) inorganic impurities, and *iii*) organic impurities (Fig. 8A)

With the aim to purify the mixture it is necessary to prepare an organic salt. As a general methodology a counterion is added to the reactor mixture followed by water, the result is the formation of an organic salt in a biphasic system (Fig. 8B). The organic salt and the inorganic impurities have affinity for the aqueous phase, while the organic impurities have affinity for the organic phase. A separation of the organic layer eliminates the organic impurities from the reaction mixture. The product and the inorganic impurities stay in the aqueous layer (Fig. 8C). The next step is to add a new counterion with the opposite nature to the first counterion added. A second requirement is the use of a clean organic solvent that must be immiscible with water. In this step the free base is recovered by hydrolysis of the organic salt (Fig. 8D). The desired compound is soluble in the organic phase 2 and the inorganic impurities stay in the aqueous phase 2. A second layer separation furnished the free base with a high purity in the organic phase 2 (Fig. 8E). Finally, this compound is recovered from the organic phase 2 by crystallization or precipitation (Fig. 8F). This methodology is depicted in Fig. 8.

The formation and hydrolysis of a salt is a very suitable tool in the development of a process in the pharmaceutical industry to obtain acceptable impurity content, specifically for the purification of intermediates and pharmaceutical ingredients. Some examples reported in the literature will demonstrate the advantages of this methodology.

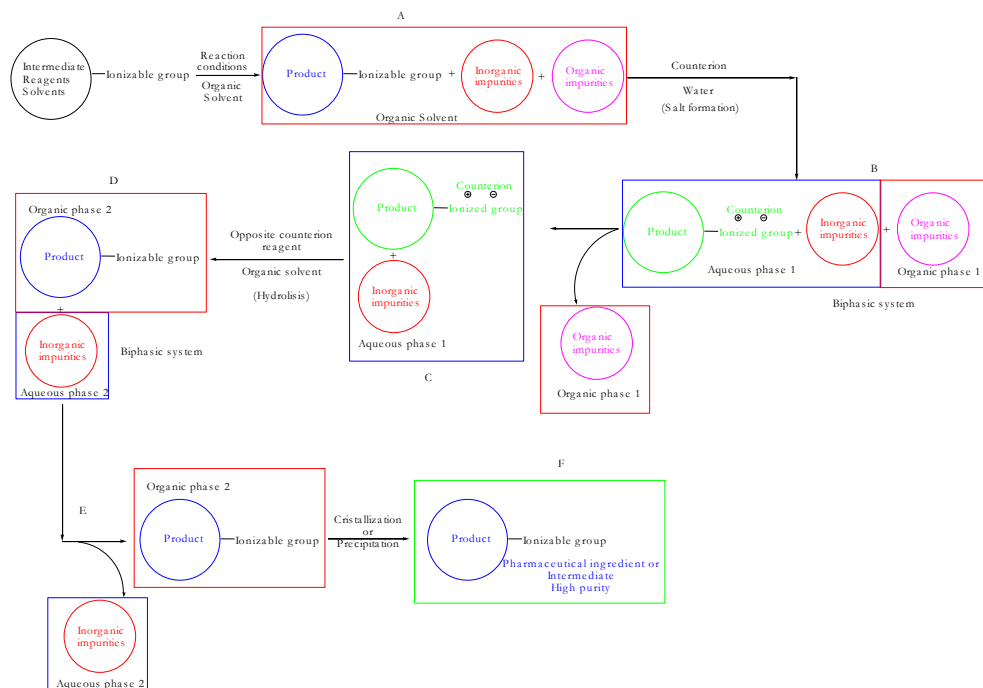


Figure 8. Typical scheme using salt formation/hydrolysis in the pharmaceutical industry (own creation).

Through the synthesis of the Omeprazole magnesium (inhibitor of the proton pump) a sodium salt was prepared by the reaction between Omeprazole and sodium hydroxide at a laboratory scale (0.1 g). After the salt formation reaction, the Omeprazole is insoluble and become soluble when it is transformed to the corresponding sodium salt. The residual starting material (Omeprazole) is insoluble in water. So, for the elimination of this residual compound methylene chloride was added to the reaction mixture. In this binary system, the Omeprazole was solubilized in the organic phase and the Omeprazole sodium salt was solved in the aqueous phase. A separation phase eliminates the organic impurities and starting material unreacted (Omeprazole) in the organic phase. To the generated Omeprazole sodium salt (aqueous phase) magnesium chloride is added; this reagent furnishes the Omeprazole magnesium by cation interchange. The magnesium salt precipitates in the aqueous medium because the product is an Omeprazole dimer (high organic ratio vs the ionic bond). The residual inorganic impurities were eliminated in the mother liquors (water). After centrifugation and drying, the optical purity for the isolated Magnesium salt was 98 % (Entry 1, Table 2) [35].

In the scale-up development of a new process for the manufacture of Quetiapine hemifumarate (antipsychotic), a problem regarding the impurity profile was found. To solve this inconvenience one hydrochloride salt was prepared. The salt procedure started by toluene dissolution of the intermediate which was treated with hydrochloric acid and the corresponding salt was generated. This intermediate was isolated in the aqueous phase and the organic impurities were eliminated in the organic phase (toluene). Then the pH of the aqueous phase was adjusted to 9 / 10 units with sodium carbonate. This change hydrolyzed the salt and furnished the free base which has been isolated in methylene chloride. The aqueous phase was eliminated with the inorganic impurities. After this separation the solvent of the second organic phase was distilled and the free base was solved in ethanol. In the next step the free base was reacted with fumaric acid generating the pharmaceutical ingredient with a good impurity profile (99.9 % of purity) (Entry 2, Table 2) [36]. In this example two approaches are combined, first the purification by extraction / salt formation and in a second place the salt formation and crystallization.

A synthetic step using a salt was included during the optimization of a new process for the synthesis of Raloxifene hydrochloride (estrogen receptor modulator). The deprotection of the two phenols groups was carried out with potassium hydroxide and the bis-potassium salt was provided as an intermediate. Once the reaction was finished, the pH of the reactions was changed until 11 units and the product was isolated by filtration. The inorganic impurities were eliminated in the aqueous phase. After the solid was solved in methanol water was added, after the decoloration with activated charcoal the product was filtered. Then the pH of the filtrate was modified until to 2 units with hydrochloric acid and heated to a temperature of 65 °C. The Piperidinium salt was isolated as intermediate. To precipitate the entire product additional water was added and then the reaction mixture was cooled. The product was isolated by filtration and after drying the isolated compound furnished a purity of 99.9 %. Although the product is a salt, probably it was precipitated in water because the organic ratio of the molecule is clearly bigger *vis a vis* of the ionic bond. In addition, it is necessary to point out that this molecule has two acid groups (phenols) and a basic one (Piperidine) that make it possible to use both sides of pH scale to prepare salts. (Entry 3, Table 2) [37].

For improving the manufacturing process of Gemfibrozil (antihyperlipidemic agent) a sodium salt was prepared starting by the isobutyl ester intermediate. The hydrolysis of the ester moiety generated the sodium salt. This compound was prepared in a mixture of water and toluene using sodium hydroxide as a counterion. After reaction completion, the Gemfibrozil sodium salt was isolated in the aqueous phase (140 g scale). The organic impurities were removed from the organic phase (toluene). Then the pH of the aqueous phase was adjusted to 8.8 to 9.2 pH units and the aqueous solution was

filtered to eliminate foreign particles. Finally, the free base was obtained by pH adjustment to 2.8 to 3.2 pH units with hydrochloric acid. The product precipitated in the reaction mixture and then filtered; the inorganic impurities were eliminated in the mother liquors. After drying, the product was obtained with a purity of 100 % (Entry 4, Table 2) [38].

Another example was reported for the procurement of Venlafaxine Hydrochloride (antidepressant) free of impurities at large scale. During the reduction step with Raney Nickel of an intermediate at a 60 kg scale, the acetate salt was generated. The solvent of this reaction (acetic acid) was distilled, and the residue was solubilized in water. Toluene was added and the phases were settled, the aqueous phase (containing the product) was kept and the organic phase which contains the organic impurities was eliminated. Then the pH of the solution was adjusted to 7.5/8.0 with aqueous ammonia and then ethyl acetate was added. A settlement of the phases was executed, and the aqueous phase was eliminated. The solvent of the organic phase was distilled, and the residue was solved in acetic acid. After heating and cooling, the product was isolated by centrifugation and the product was dried generating the acetate salt. This compound showed a purity of 99.3 % by HPLC (Entry 5, Table 2) [39].

The methodologies discussed in this section were chosen because they reflected the approach of the salt preparation, extraction, and salt hydrolysis. This purification system is very common in the commercial manufacture of pharmaceutical ingredients but sometimes is not adequately detailed in the reports because it is part of the industry expertise. However, after to understanding the easiness of the methodology it is possible to use this purification in many organic compounds having the adequate functional groups. In addition, there are no restrictions to prepare salts of intermediates because after the purification process, the counterion could be eliminated.

Table 2. Examples of Purification with pharmaceutical salts in intermediates and active substances

Entry	Scheme	Reference
1	Aqueous Phase: Omeprazole sodium salt 1. NaOH/ Water 2. Methylene Chloride 3. Settle separation Organic phase: Organic impurities and unreacted starting material MgCl₂ Omeprazole Magnesium salt water insoluble Mother liquors: inorganic impurities	[39]
2	Quetiapine Fumarate 99.88% purity Organic phase 1 (organic impurities) Aqueous phase 1 (organic impurities) 1. Sodium Carbonate to pH 9-10 2. Methylene Chloride 3. Phase separation HCl Organic phase 2 (free bases) Aqueous phase 2 (inorganic impurities)	[40]
3	Raloxifene isolated as Hydrochloride 99.2% purity Organic impurities and inorganic impurities in the mixture of organic inorganic mother liquors Product isolated by filtration 1. Potassium Hydroxide Water, heat 2. Water, adjust pH to 11 Inorganic impurities in water 1. Methanol / Water Chlorhydric acid (pH 2) 2. water, 0' 5"	[41]
4	Gemfibrozil (free acid) Organic impurities Aqueous Phase: Sodium Gemfibrozil 1. Toluene Sodium Hydroxide Water, reflux 2. Phase separation Organic phase 1. pH adjust to 8.8 to 9.2 2. Polish filtration 3. Hydrochloric acid until pH of 2.8 to 3.2 4. Centrifugation Inorganic impurities in mother liquors	[42]
5	Product (99.3% purity) Organic Phase (organic impurities) Aqueous Phase (product) Organic Phase (product) Aqueous Phase (inorganic impurities) AcOH, Raney-Ni, H₂, 50 °C Distillation Water / Toluene Settle phases pH adjustment 7.5 / 8.0 NH₄OH AcOH Settle phases Distillation AcOH, Heat Crystallization Centrifugation Drying	[43]

Salt formation/hydrolysis followed by crystallization to generate the product with a high purity

The intermediates or final product solubility changes under the influence of an ionic bond (salt formation) and could have an important impact in the crystallization, specifically in the impurity profile. So, the creation of an ionic bond generates new solubility properties in the product and is virtually like to work with another compound with totally different solubility properties. This solubility behavior can be used to crystallize the product and eliminate byproducts. As it was mentioned, the most important

advantage of this methodology is the reversibility of the reaction because the original molecule can be recovered with a hydrolysis reaction without affecting the impurity profile. It is also important to point out the use of seed to induce the desired characteristic in the final product. This type of purification process is currently applied at industrial level in the manufacture of intermediates and pharmaceutical ingredients. Several examples will demonstrate the impact of this methodology in the purification of intermediates.

During the improvement process for the manufacture of Solifenacin succinate (antagonist of the muscarinic receptors) a salt was used in the last step of the synthesis. The Solifenacin crude (diastereomeric mixture) was purified using racemic succinic acid. The diastereomeric crystallization was optimized, taking in account several parameters (temperature, solvents, counterion ratio, etc.). The final report described the reaction of the Solifenacin isomer mixture and succinic acid in ethyl acetate, the mixture was seeded with the Solifenacin Succinate and stirred to 25/30 °C for 8 hours. The purity at this point was 98.75 % and the chiral purity 93.69 %. Two additional crystallizations generated the Solifenacin succinate with a chemical and chiral purity of 99.9 %. As a result of this procedure, the salt solubility was different between the diastereomers, this fact made possible the resolution to obtain the Solifenacin succinate with a content of the non-desired diastereomer of 0.06 % (Entry 1, Table 3) [40].

In the last step of the manufacture of Saxagliptin hydrochloride (antidiabetic) a salt was used. The salt was formed simultaneously after the hydrolysis of a carbamate function. Then the carbamate intermediate was solved in ethyl acetate and aqueous hydrochloric acid was added. The salt was precipitated in situ, isolated by filtration, and washed with additional ethyl acetate. The purity for the Saxagliptin hydrochloride was 99.9 % by HPLC. As a note, the previous intermediate had a 94.36 % purity, so the inorganic and organic impurities were eliminated in the mother liquors (Entry 2, Table 3) [41].

A salt was used during the improvement of the process for manufacture of Dronedaron hydrochloride (antiarrhythmic drug). Hydrochloric acid was used after a sequence of reaction (reduction of nitro group and protecting the generated amine with a methane-sulfonyl group) at a scale of 4.5 kg. The process was reported as follows. The advanced intermediate was washed with diluted aqueous hydrochloric acid at 10%. The organic phase was kept, and the residual water was distilled until 1 % to avoid loss of product. The Dronedaron hydrochloride was isolated from the reaction by cooling the mixture to 0°C. The purity of the API at this stage was 99.7 %. An additional crystallization in isopropanol furnished the API with a purity of 99.8 % (Entry 3, Table 3) [42].

Due to the difficulty to obtain pharmaceutical grades of Montelukast sodium in a scale-up plant an organic salt using isopropylamine as a counterion was developed. In this context, to a toluenic Montelukast dissolution (free base) was added isopropylamine and acetonitrile. The scale for this reaction was 0.95 kg executed in a scale up plant. Then to start the precipitation of the product a small quantity of heptane was added. After 1 hour of the reaction, the addition of more heptane completes the precipitation of the amorphous solid. After 1 hour of ageing, the product was isolated by centrifugation and the cake was washed with toluene / acetonitrile. The product was crystallized twice in isopropanol and once in toluene. After analysis the final purity by HPLC was 99.7 %. Furthermore, it is important to mention that in the preliminary screening several Montelukast salts were evaluated, basic counterions furnished amorphous solids. Between the studied amines it can be mentioned n-propylamine, tert-butylamine, benzylamine, α -methylamine, dicyclohexylamine, diisopropylethylamine, etc. This fact emphasizes the relative easiness in the preparation of pharmaceutical salts (Entry 4, Table 3) [43].

During the development of a scalable synthetic route to manufacture Clopidogrel bisulfate (antiplatelet agent) and hydrochloride salt was prepared. Several parameters like addition time, reaction time, base, hydrochloric acid, and solvent ratio, etc., were studied to improve the impurity profile. The author reported an industrial procedure with 100 kg of starting material. In an advanced intermediate in toluene solution was added aqueous hydrochloric acid and the resultant salt was precipitated spontaneously in the reaction mixture. The salt was isolated by filtration and then the solid was further purified in acetone / hydrochloric acid. The product was isolated and washed with acetone and dried. Finally, the hydrochloride intermediate furnished a chemical purity of 99.9 % and a chiral purity of 99.6 %. This is a remarkable result because it was evaluated for the two synthetic steps (Entry 5, Table 3) [44].

As it was demonstrated with these examples, the pharmaceutical impurity level can be reached using the salt formation procedure in an adequate solvent. This methodology is very simple and furnishes very good results. This reaction can be used from a laboratory scale working with a few grams until several tons in a commercial scale in a Good Manufacturing Practice (GMP) environment. It is necessary to point out, that some requirements, using this methodology are necessary. For example, the purity of the counterion to avoid related impurities, the hydration level, or the polymorphism because these kinds of parameters could impact the desired characteristic of the product and could have a relevant importance if the final product is the active pharmaceutical ingredient.

Table 3. Examples of purification with pharmaceutical salts in intermediates and active substances.

Entry	Scheme	Reference
1	Solifenacin Succinate (Seed) (1S,3'R)-Isomere Solifenacin Diastereoisomer + (1S,3'S)-Isomere Solifenacin Diastereoisomer Succinic acid (1S,3'S)-Isomere Solifenacin Diastereoisomer 98.75% Purity, Chiral Purity 93.69%, 6.30 % Non desired diastereomer Ethyl acetate Crystallization (x2) Solifenacin Succinate 99.94% Purity, Chiral Purity 99.94%, 0.06% Non desired diastereomer	[45]
2	Ethyl acetate (antisolvent) Centrifugation impurities in mother liquors Purity 94.36% purity 99.85% Saxagliptine hydrochloride	[46]
3	1. CH₂THF / HCl aq 2. Azeotropic Distillation (water elimination) 3. Cooling 4. Filtration Purity 99.12% Mother liquors organic impurities Purity 99.68% 1. Isopropanol 70 / 80°C 2. 0 / 5°C 3. Centrifugation Purity 99.79%	[47]
4	1. NH₂ Acetonitrile / heptane 2. Isopropanol Crystallization (twice) organic impurities elimination 3. Toluene Crystallization (once) organic impurities elimination Solid product 99.7% of purity Montelukast salt intermediate	[48]
5	1. Hydrochloric acid salt generation (precipitation) 2. Filtration (organic impurities in mother liquors) 99.9% chemical Purity, 99.6% chiral Purity 3. Acetone crystallization two steps Clopidogrel Bisulfate	[49]

Synthesis

To synthesize pharmaceutical salts several approaches are available; the main difference depends on the final use of the compound to be generated. For example, for the manufacturing of an active pharmaceutical ingredient (API) the conditions must be strictly controlled following the GMP's. This fact following batch records with well-established unit operations in a regulated environment (ICHQ7). The generated product must comply with the current specifications for the final active ingredient or intermediate including parameters such as polymorphism, particle size, impurity profile, foreign particles, water content, etc. [45]. It is important to remark that the use of a counterion in this step requires a high quality of the reagents (low impurity content).

On the other hand, if it is not necessary to comply with a GMP environment, the salt could be prepared easily. Basically, by mixing the free base and the counterion in an

adequate solvent. The generation of the ionic bond changes the solubility properties of the molecule, for instance if the free base is soluble, in general the corresponding salt is insoluble doing the isolation feasible by crystallization or precipitation in the reaction media. In both cases, the generation of the pharmaceutical salt is the objective, and the difference is the unit operations, scale or the GMP environment. Several examples will demonstrate the easiness of this methodology.

If the main objective is to modify the salt physical properties for example; the solubility, dissolution rate, permeability, stability, mechanical properties, polymorphism, flow properties, compaction properties, etc., some modifications in the counterion can be applied [46]. In this context, Gross *et al.* was reported a decision-tree format in order to choose the better counter ion in drug candidates [47]. By his side Fernandez-Casares studied the in-situ salt screening, with two methods: the saturated solution and the high-throughput method over two active substances (Aripiprazole, antipsychotic and Desvenlafaxine, antidepressant). In this study the first approach furnished better results [48]. Sometimes, the salt formation is an easy procedure, this fact is exemplified by a series of 28 different salts derivatives of Olanzapine (antipsychotic) reported by Keltjens in a study to improve the properties of the pharmaceutical ingredient [49]. Or the 3600 trials reported by Remenar *et al.* that it will discuss furtherly [50].

Concerning the synthesis, usually is easy to prepare a salt, basically mixing the compound with the adequate functional group and a counterion in a solvent, nevertheless, when other parameters are important to meet it is possible to use alternative methodologies in order to control specific characteristics in pharmaceuticals salts modifying once of the following parameters: solvent hydration level, availability of the reagents, counterion type, solvent, temperature, reagent ratios, etc.

For example, when the solvent hydration level can affect the final product by hygroscopicity or solubility (impact in the yield) it is possible to use an anhydrous solvent and the appropriate counterion avoiding the use of water. Hydrogen chloride in several solvents for instance isopropanol [51], dioxane [52], or trimethylsilane chloride in methanol [53], acetyl chloride in methanol [54] or ethanol [55]. Also, in the case of Zabofloxacin D-aspartate (antibiotic) was used D-aspartic acid in anhydrous ethanol to prepare the corresponding salt [56]. All these procedures are alternatives reported in the literature for the procurement of anhydrous salts.

As a counterpart if no anhydrous conditions are required, the use of aqueous disolutions of hydrochloric acid or sodium hydroxide are available for the preparation of salts, this method is extended used in the synthesis of pharmaceutical ingredients because these reagents are readily available and not expensive. As an illustration, it was reported their use in the synthesis of a sodium salt of Tenatoprazole (inhibitor of the

proton pump) using aqueous sodium hydroxide [57]. The lithium hydroxide also was used in the hydrolysis of an ester moiety and subsequently salt formation in the synthesis of antiviral compounds. In this case the free base is solved in methanol and the counterion is solved in water and then added over the API methanol solution. The hydrolysis generated the lithium salt which is purified by extractions. In this case, the free acid is recovered by salt hydrolysis with hydrochloric acid [54]. The use of aqueous hydrochloric acid also was reported in formation of Raloxifene hydrochloride after the procurement of the Raloxifene through a Diels Alder reaction, in this case methanol was used as a cosolvent [58]. In a study to improve the synthesis of a potential antidepressant pharmaceutical ingredient it was used the 2N hydrochloric acid in order to form the corresponding salt, the mixture was refluxed and the hydrochloride salt was isolated by filtration. This salt was re-dissolved and the salt was hydrolyzed with sodium hydroxide then concentrated hydrochloric acid was added and the product purified by filtration in order to get the pharmaceutical purity [59]. In another example, the free base was solved in isopropanol and then the hydrochloric acid was added. The hydrochloride salt was isolated by cooling the suspension [60].

Different counterions can be used to prepare a salt. In this context, magnesium hydroxide was used for the generation of Omeprazole magnesium directly in a Pilot Plant scale. The free base was solved in tetrahydrofuran and the magnesium hydroxide was solved in water. The magnesium salt was formed and then isolated by precipitation in cyclohexane. The product was purified in methanol and then in ethyl acetate [61]. In another example metallic magnesium also was used to obtain the same salt. The metal was dissolved in methanol and dichloromethane then this solution was added to a solution of Esomeprazole in methanol [62].

Polymorphism plays crucial role in the manufacture of an active pharmaceutical ingredient because polymorphism can impact the solubility of the API in the human body or because the solid forms can be intellectual restrictions. In this context, there are several methods to obtain different solid forms. In this regard, Remenar *et al.* reported high-throughput experiments with the Sertraline (antidepressant) in this report 3600 crystallizations were executed to identify and characterize 18 crystalline salt forms of the pharmaceutical ingredient [50]. The counterions used in this study were mono ionic acids (acetic, hydrobromide, benzoic, benzenesulfonic, ethanesulfonic, lactic, methanesulfonic) and also di and tri acidic salt formers (citric, fumaric, maleic, malonic, sulfuric and succinic acids). The authors demonstrated that even minor differences in the salt formers can deeply impact the effect of the number of polymorphs and solvates of a salt [50].

In a laboratory approach, Elati *et al.* describe several methodologies to obtain polymorphs exemplified with the salt formation of Donoprezil (a drug for treating Alzheimer and senile dementia) [63]. These approaches are: *i*) reacting the drug parent with the counterion in an aqueous media, *ii*) crystallizing the pharmaceutical salt in several solvents, *iii*) crystallizing the pharmaceutical salts in different mixtures of solvent systems, *iv*) precipitating the pharmaceutical salt in different mixture of solvent anti solvent combination systems, *v*) suspending the pharmaceutical salt in several solvents or mixture of solvents, and *vi*) dissolving pharmaceutical salts in different solvents followed by evaporation.

Moreover, to these approaches, it is possible to evaluate the impact of a seed. The seed, which is a sample of the final product that contains all the suitable characteristics in a pharmaceutical ingredient to induce a well-controlled crystallization (saturation, cooling, etc.) in a solution of the pharmaceutical salt and obtain a specific solid form. A pair of examples has been reported for the manufacture of Prasugrel hydrochloride (platelet aggregation inhibitor) [64] and Palbocyclib (anticarcinogenic) [65].

Although a crystalline form is the first choice in the pharmaceutical salts, sometimes it is necessary to manufacture amorphous compounds in this case the salt is prepared in a solution and then an antisolvent is added. The inverse procedure also can be used. One example of this method has been reported for Montelukast sodium (antiasthmatic) [66].

The procurement of a salt by ion substitution also has been used; the Omeprazole magnesium has been prepared with this procedure [35]. A similar case was reported for the Montelukast (antiasthmatic) using isopropylamine salt [67] has been interchanged by a sodium atom using sodium methylate. During the development of a purification method for Palladium from the Cefotiozane (antibiotic) a cation interchange of trifluoroacetic acid by ammonium hydrogen sulfate in a 30 kg scale was reported [68]. Choline also was used as a counter ion for some anti-inflammatory carboxylic acids. In a recent synthesis of the Avibactam (antibiotic) a couple of salts were prepared. The first salt was prepared using as a counterion an aqueous solution of tetrabutylammonium acetate in n-butyl acetate. This ammonium salts were reacted with sodium 2-ethyl hexanoate in ethanol and by an ion interchange the Avibactam sodium was reached [69].

Another methodology to prepare salts is the grindstone method [70]. A case was described for the preparation of salt synthesis of several carboxylic acids without solvent only using the mixture of the carboxylic acid and the counterion. During this procedure it was observed an increase of the temperature during the salt formation. The counterions used in this approach were salicylic, oxalic, tartaric and citric acid. Evidently, this approach cannot be used from a commercial point of view but is a good example of green chemistry (non-solvent used).

Concerning the salt hydrolysis normally an adequate solvent and counterion is used to obtain the free base which is insoluble in the media. The product is isolated by filtration and then dried furnishing the free base. An example for the antidepressant Trazodone and Sertraline hydrochloride (antidepressant) hydrolyses was reported. The hydrochloride salt was dissolved in water and then aqueous sodium hydroxide was added. The free base was insoluble in water and isolated easily [71]. In addition all the examples cited in the section of salt formation / salt hydrolysis can be consulted.

Furthermore, the salt formation can be executed in a telescopic way, the following three examples will demonstrate this fact.

During the development of a ERK inhibitor, a one pot synthesis of a besylate salt was developed. In this case the benzenesulfonic acid served by one side as a catalyst for the desililation reaction and in a second place as a counterion for the salt formation. One interesting data is the use of tetrahydrofuran/water addition in order to control the generation of the methyl benzenesulfonate impurity [72].

The methane sulfonic acid was used for the preparation of a chloropurine salt which is a potent HSP90 inhibitor (anticarcinogenic) [73]. The salt formation was carried out after a benzylation process in a telescopic way. Basically, the substrates were reacted with potassium carbonate in dimethylacetamide after reaction completion the product (soluble) was cooled and filtered. The filtrate was reacted with the methanesulfonic acid and then methyltertbutyl ether was used as an antisolvent. The purity by HPLC of the corresponding salt was 99.3 % to 99.6 %. This product was scaled up until the obtention of 220 kg. Malic acid was used to make a resolution of the building block *R*-3,5-bis(trifluoromethyl)- α -methyl-*N*-methylbenzylamine. This salt was formed after the deactivation of an imine reduction reaction. The solvent used was ethyl acetate, after adding the counterion heating and then cooling and seeding the product was isolated by filtration [74].

Another example of the use of hydrochloric acid in isopropanol was reported recently. The salt formation was executed after a debenylation reaction, the corresponding salt was isolated directly by filtration [75].

Finally, Mithu *et al* reported a review with advanced methodologies to salt synthesis (antisolvent crystallization, spray dryer, freeze-drying, supercritical fluid, mechanochemical grinding) [76], these approaches are under development.

In summary, all these procedures demonstrate the easiness of this transformation and open the alternatives to procure high purity in the synthesis of intermediates and final pharmaceutical ingredients. In figure 9 (own creation) it is shown the main procurement methods for the manufacture of pharmaceutical salts.

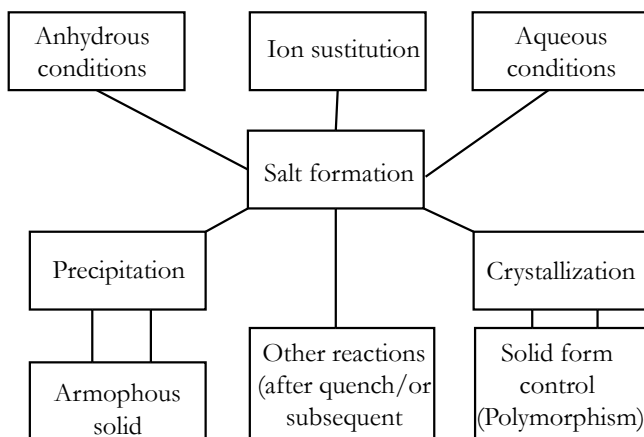


Figure 9. Methods of salt formation

Determination of salt structure

The choice of the adequate solid form has an imperative importance for therapeutic efficacy, toxicity, bioavailability, pharmaceutical process, stability and intellectual properties. In the pharmaceutical industry there are several alternatives for the final solid form of an active pharmaceutical ingredient. Some of these are: polymorphs, solvates, hydrates, cocrystals, amorphous, salts and mixtures of them [77]. The pharmaceutical salts also shown polymorphism or can exist as solvate or hydrates, so different solid forms must be characterized. There are several methodologies in order to determine the structure and solid state. The main analytical tools used for determination of salt structure are: differential scanning calorimetry, X-ray diffraction, microcalorimetry, thermal gravimetry mass spectroscopy (TG-MS) and infrared spectroscopy. Some examples can be consulted in the review of Giron. Although the structures are not shown the characterization of these salt is very illustrative [78]. Moreover, some interesting examples of synthesis and salt characterization has been reported for the Perphenazine Fumarate (antipsychotic). In this example two salts were prepared and characterized by several techniques (differential scanning calorimetry, powder X-ray diffraction, Fourier infrared spectroscopy and scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray diffraction). In addition the improvement in solubility versus the parent drug was demonstrated [79].

CONCLUSIONS

The impurity content is one of the main parameters to control during the synthesis of the intermediates and active pharmaceutical ingredients. The use of salt formation / hydrolysis methodology is a powerful tool to achieve this goal. The synthesis of salts from pharmaceutical ingredients or intermediates is an easy operation and the reversibility of the reaction is the main advantage of this methodology. Once the salt is formed, the ionic bond confers new solubility properties to the molecule, these modifications could be used for the development of purification strategies as well specific crystallizations. These advantages permit to afford pharmaceutical ingredients with excellent impurity content. An important characteristic is that the change does not affect the main structure and the reaction is reversible. However, these kinds of processes are underestimated because sometimes it is no easy to recognize their use and these procedures are not well described in the publications because they are part of the know-how of the manufacturing companies. In addition, the synthesis of organic salts is easy to achieve and depends on the final objective of the project (GMP's or laboratory). For these reasons the organic salt represents a very useful tool to furnish pharmaceutical impurities profiles in pharmaceutical active ingredients.

ACKNOWLEDGMENT

I would like to thank José Moctezuma Arellano for reviewing the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

REFERENCES

1. C.G. Wermuth, P.H. Stahl, Introduction, in: P.H. Stahl, C.G. Wermuth (editors), *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, Wiley-VCH, Zurich, 2002, pp. 1–7.
2. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceutical for Human Use, *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in New Drug Substances Q3A(R2)*, 2006. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A_R2_Guideline.pdf, accessed September 5, 2023.

3. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceutical for Human Use, *ICH Harmonised Guideline: Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7(R1)*, 2017. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf, accessed September 5, 2023.
4. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceutical for Human Use, *ICH Harmonised Guideline: Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R6)*, 2016. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3C-R6_Guideline_ErrorCorrection_2019_0410_0.pdf, accessed September 5, 2023.
5. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceutical for Human Use, *ICH Harmonised Guideline: Guideline for elemental impurities Q3D*, 2019. URL: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R1EWG_Document_Step4_Guideline_2019_0322.pdf, accessed September 5, 2023.
6. G.N. Anderson, Optimization process by minimizing impurities, in: G.N. Anderson (editor), *Practical Process Research and Development: A Guide for Organic Chemists*, 2nd ed., Elsevier, Inc., 2012, pp. 237–260. URL: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123865373/practical-process-research-and-development>
7. G.N. Anderson, Work up, in: G.N. Anderson (editor), *Practical Process Research and Development: A Guide for Organic Chemists*, 2nd ed., Elsevier, Inc., 2012, pp. 289–327. URL: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123865373/practical-process-research-and-development>
8. D.V. Bhalani, B. Nutan, A. Kumar, A.K.S. Chandel, Bioavailability enhancement techniques for poorly aqueous soluble drugs and therapeutics, *Biomedicines*, **10**(9), 2055 (2022). Doi: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092055>
9. E. Nelson, Comparative dissolution rates of weak acid and their sodium salts, *Journal of the American Pharmaceutical Association: Scientific Edition*, **47**(4), 297–299 (1958). Doi: <https://doi.org/10.1002/jps.3030470422>
10. K. Lokesh, A. Amin, A.K. Bansal, Salt selection in drug development, *Pharm-Tech*, **32**(3), 128–145 (2008). URL: <https://www.pharmtech.com/view/salt-selection-drug-development>

11. P. Makary, Principles of salt formation, *Pharmaceutical and Biosciences Journal*, **2**(4), 1-4 (2014). Doi: <https://doi.org/10.20510/ukjpb/2/i4/91101>
12. B. Sarma, J. Chen, H.-Y. Hsi, A.S. Myerson, Solid forms of pharmaceuticals: Polymorphs, salts and cocrystals, *Korean Journal of Chemical Engineering*, **28**(2), 315–322 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0520-0>
13. A. Becker, Pharmaceutical salts of small molecule drugs: Opportunities and challenges, *European Pharmaceutical Review*, **19**(5), 70–74 (2014). URL: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/27753/pharmaceutical-salts-small-molecule-drugs/>
14. A.T.M. Serajuddin, Salt formation to improve drug solubility, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**(7), 603–616 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.010>
15. J.C. Ortiz-Lara, A. Balderrábano-López, Importancia de las sales orgánicas en la industria farmacéutica, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **48**(1), 18–42 (2017). URL: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57956614003.pdf>
16. B. Kratochvíl, Solid forms of pharmaceutical molecules, in: J. Šesták, J.J. Mareš, P. Hubík (editors), *Glassy, Amorphous and Nano-Crystalline Materials. Thermal Physics, Analysis, Structure and Properties*, Springer, Dordrecht, 2011, pp. 129–140. Doi: <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2882-2>
17. S. Gaisford, M. Saunders, Salt selection, in: *Essentials of Pharmaceutical Preformulation*, Wiley Blackwell, 2012, p. 99. Doi: <https://doi.org/10.1002/9781118423226.ch6>
18. W.-Q. Tong, Salt screening and Selection: New challenges and considerations in the modern pharmaceutical research and development paradigm, in: Y. Qiu, Y. Chen, G.G.Z. Zhang (editors), *Developing Solid Oral Dosage Forms. Pharmaceutical Theory and Practice*, Academic Press, 2009, pp. 75–86. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53242-8.00004-7>
19. R. Banerjee, P.M. Bhatt, N.V. Ravindra, G.R. Desiraju, Saccharin salts of active pharmaceutical ingredients, their crystal structures, and increased water solubility, *Crystal Growth & Design*, **5**(6), 2299–2309 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1021/cg050125l>

20. W.-Q.T. Tong, G. Whitesell, *In situ* salt screening- A useful technique for discovery support preformulation studies, *Pharmaceutical Development and Technology*, **3**(2), 215–223 (1998). Doi: <https://doi.org/10.3109/10837459809028498>
21. A.M. Hyde, S.L. Zultanski, J.H. Waldman, Y.-L. Zhong, M. Shevlin, F. Peng, General principles for salting-out informed by the Hofmeister series, *Organic Process Research & Development*, **21**(9), 1355–1370 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00197>
22. F. Pfankuch, H. Rettig, P.H. Stahl, Biological effect of the drug salt form, in: P.H. Stahl, C. Wermuth (editors), *Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use*, Wiley VCH, Zurich, 2011, p. 126.
23. P.D. Elder, D.J. Snodin, Drug substances presented as sulfonic acid salts: Overview of utility, safety and regulation, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **61**(3), 269–278 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1211/jpp.61.03.0001>
24. D.J. Snodin, Elusive impurities-evidence versus hypothesis. Technical and regulatory update on alkyl sulfonates acid salts, *Organic Process Research & Development*, **23**(5), 695–710 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00397>
25. G.S. Paulekuhn, J.F. Dressman, C. Saal, Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection based on analysis of the Orange book database, *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**(26), 6665–6672 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1021/jm701032y>
26. The United States Food Drug Administration, *Generally recognized as safe (GRAS)*, 2019. URL: <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/gras/>, accessed September 5, 2023.
27. A. Tilborg, B. Norberg, J. Wouters, Pharmaceutical salts and cocrystals involving amino acids: A brief structural overview of the state-of-art, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **74**, 411–426 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.045>
28. C. Saal, A. Becker, Pharmaceutical salts: A summary on doses of salts formers from the Orange Book, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **49**(4), 614–623 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.05.026>
29. S.S. Bharate, Carboxylic acid counterions in FDA-approved pharmaceutical salts, *Pharmaceutical Research*, **38**(8), 1307–1326 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-021-03080-2>

30. D. Gupta, D. Bhatia, V. Dave, V. Sutariya, S.V. Gupta, Salts of therapeutic agents: Chemical, physicochemical and biological considerations, *Molecules*, **23**(7), 1719 (2018). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23071719>
31. K. Fujinuma, Y. Ishii, Y. Yashihashi, E. Yonemochi, K. Sugano, Triboelectrification of active pharmaceutical ingredients: weak acids and their salts, *International Journal of Pharmaceutics*, **493**(1-2), 434–438 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.008>
32. S. Sangwan, T. Panda, R. Thiamattan, S.K. Dewan, R.K. Tapper, Novel salts of sunitinib an anticancer drug with improved solubility, *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, **5**(4), 352–365 (2015). Doi: <https://doi.org/10.9734/irjpac/2015/13578>
33. C.P. Ley, M.H. Yates, Purification of 2,4-dichlorobenzoic acid, *Organic Process Research & Development*, **12**(1), 120–124 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1021/op7001547>
34. M.S. Anson, J.P. Graham, A.J. Roberts, Development of a fully telescoped synthesis of the S1P1 agonist, *Organic Process Research & Development*, **15**(3), 649–659 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1021/op2000095>
35. P.L. Lindberg, M.S. Von Unge, Compositions, US Patent 5,714,504, Example 3, 1998. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/30/ce/93/1c3210d22368a1/US5714504.pdf>
36. N.C. Niphade, A.C. Mali, B.S. Pandit, K.M. Jagtap, S.A. Jadhav, M.N. Jachak, V.T. Mathad, An improved and single pot process for the production of quetiapine hemifumarate substantially free from potential impurities, *Organic Process Research & Development*, **13**(4), 792–797 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1021/op900097q>
37. P.K. Bathini, V.R. Kandula, P.R. Gaddameedhi, An improved synthesis of raloxifene hydrochloride: A selective estrogen receptor modulator, *Heteroletters*, **4**(4), 515–518 (2014). URL: <https://www.heteroletters.org/issue44/Paper-5.pdf>
38. S.R. Madasu, N.A. Vekariya, H. Velladurai, A. Islam, P.D. Sanasi, R. B. Korupolu, Improved process for preparation of gemfibrozil, an antihypolipidemic, *Organic Process Research & Development*, **17**(7), 963–966 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1021/op400034f>

39. M. Saravanan, B. Satyanarayana, P.P. Reddy, An improved and impurity-free large-scale synthesis of venlafaxine hydrochloride, *Organic Process Research & Development*, **15**(6), 1392–1395 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1021/op200221y>
40. G.N. Trinadhachari, A.G. Kamat, B.V. Balaji, K.J. Probahar, K.M. Naidu, K.R. Babu, P. D. Sanasi, An improved process for the preparation of highly pure solifenacin succinate via resolution through diastereomeric crystallization, *Organic Process Research & Development*, **18**(8), 934–940 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1021/op500083y>
41. P. Macharla, K.C. Akula, G. Varanasi, R. Bandichhor, M.R. Ghanta, An efficient and telescopic process for synthesis of saxagliptin hydrochloride, *Oriental Journal of Chemistry*, **30**(1), 291–297 (2014). Doi: <http://doi.org/10.13005/ojc/300137>
42. A.C. Mali, S.S. Ippar, M.B. Bodke, N.S. Patil, V.T. Mathad, An improved and efficient process for the production of Dronedarone hydrochloride, an antiarrhythmia drug, *Organic Process Research & Development*, **17**(5), 863–868 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1021/op400008e>
43. A. Halama, J. Jirman, O. Boušková, P. Gibala, K. Jarrah, Improved process for the preparation of Montelukast: development of an efficient synthesis, identification of critical impurities and degradants, *Organic Process Research & Development*, **14**(2), 425–431 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1021/op900311z>
44. L.R. Madivada, R.R. Anumala, G. Gilla, M. Kagga, R. Bandichhor, An efficient and large scale synthesis of Clopidogrel: Antiplatelet drug, *Der Pharma Chemica*, **4**(1), 479–488 (2012). URL: <https://www.derpharmachemica.com/pharma-chemica/an-efficient-and-large-scale-synthesis-of-clopidogrel-antiplatelet-drug.pdf>
45. S. Lee, C. Hoff, Large scale aspects of salt formation: Processing of intermediate and final products, in: P.H. Stahl, C. Wermuth (editors), *Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use*, Wiley VCH, Germany, 2011, p. 191–219.
46. D. Zhou, Y. Qiu, Understanding drug properties in formulation and process design of solid oral products, *Journal of Validation Technology*, 74–84 (2010).

47. T.D. Gross, K. Schaab, M. Ouellete, S. Zook, J.P. Reddy, A. Shurtleff, A.I. Sacaan, T. Alebic-Kolbah, H. Bozigian, An approach to early-phase salt selection: Application to NBI-75043, *Organic Process Research & Development*, **11**(3), 365–377 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1021/op060221a>
48. A. Fernández-Casares, W.M. Nap, G.T. Figás, P. Huizenga, R. Groot, M. Hoffman, An evaluation of salt screening methodologies, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **67**(6), 812–822 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1111/jphp.12377>
49. R. Keltjens, Stable salts of olanzapine, US Patent 7,459,449 B2, 2008. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/ea/d1/b1/46e034280e3add/US7459449.pdf>
50. J.F. Remenar, J.M. MacPhee, B.K. Larson, V.A. Tyagi, J.H. Ho, D.A. Mellroy, M.B. Hickey, P.B. Shaw, O. Almarsson, Salt selection and simultaneous polymorphism assessment via high-throughput crystallization: The sertraline case, *Organic Process Research & Development*, **7**(6), 990–996 (2003). Doi: <https://doi.org/10.1021/op034115+>
51. J.R. Vyas, V.S.V. Nidadavolu, D.H. Shah, Ropivacaine hydrochloride anhydrate and the preparation thereof, US Patent Application Publication US 2009/0187024A1, 2009. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/18/f8/17/b32f14c7ec35ef/US20090187024A1.pdf>
52. S. Ninkovic, J.F. Braganza, M.R. Collins, J.C. Kath, H. Li, D.T. Ritchter, 6 Substituted 2-heterocyclamino pyrazine compounds as CHK-1 inhibitors, WO 2010/016005 A1, 2010. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/3b/34/71/be6e7ef8fe076e/WO2010016005A1.pdf>
53. N. Hashimoto, H. Yasuda, M. Hayashi, Y. Tanabe, Aza Diels Alder reaction of methyl 2- [(R)-1-phenylethyl] iminoethanoate with cyclopentadiene using practical and environmentally friendly biphasic solvent system, *Organic Process Research & Development*, **9**(1), 105–109 (2005). Doi: <https://doi.org/10.1021/op049828m>
54. K.M. Allan, S. Fujimori, L.V. Heumann, G.M. Huynh, K.A. Keaton, C.M. Levins, G.R. Pamulapati, B.J. Roberts, K. Sarma, M.G. Teresk, X. Wang, S.A. Wolckenbauer, Process for preparing antiviral compounds, WO 2015/191437 A1, 2015. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/32/cc/bf/8e-4392ba15f1e8/WO2015191437A1.pdf>

55. A. Nudelman, Y. Bechor, E. Falb, B. Fischer, A.W. Barry, A. Nudelman, Acetyl chloride-methanol as a convenient reagent for: a) quantitative formation of amine hydrochlorides b) carboxylate ester formation c) mild removal of N-t-Boc-protective group, *Synthetic Communications*, **28**(3), 471–474 (1998). Doi: <https://doi.org/10.1080/00397919808005101>
56. D.R. Choi, J.K. Lim, J.U. Choi, D.H. Shin, S.H. Kim, D.Y. Won, J.H. Kim, J.C. Roh, An improved manufacturing method of zabofloxacin. WO 2015/178663, 2015. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/79/30/fb/06e158c-14f0f8f/WO2015178663A1.pdf>
57. S. Sripathi, R.R. Bojja, V.R. Karnati, V.V.N.K.V.P. Raju, M.D. Khunt, An improved synthesis of antiulcerative drug Tenatoprazole, *Organic Process Research & Development*, **13**(4), 804–806 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1021/op800173u>
58. R. Chavakula, C.J.S. Saladi, N.R. Mutyala, V.R. Maddala, R.K. Babu, Industrially viable demethylation reaction in the synthesis of raloxifene hydrochloride, *Organic Chemistry: An Indian Journal*, **14**(13), 128 (2018). URL: <https://www.tsijournals.com/articles/industrially-viable-demethylation-reaction-in-synthesis-of-raloxifene-hydrochloride.pdf>
59. Y. Tao, D.W. Widlicka, P.D. Hill, M. Couturier, G.R. Young, A scalable synthesis of CE-157119 HCl salt, and SRI/5HT2A antagonist, *Organic Process Research & Development*, **16**(11), 1805–1810 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1021/op3002273>
60. D.R. Mowrey, J.J. Reif, K.L. Milkiewicz, S.P. Allwein, Development of a novel process for the kilogram-scale synthesis of spiro[2,3-d][1,3]oxazine-4,4'-piperidine]-2-one, *Organic Process Research & Development*, **22**(9), 1236–1240 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00202>
61. B. Toker, S. Merey, Process for the preparation of magnesium salt of omeprazole, WO 2005/082888 A1, 2005. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/5d/24/cb/09068c1cda450b/WO2005082888A1.pdf>
62. S.V.N. Raju, K. Purandhar, P.P. Reddy, G.M. Reddy, L.A. Reddy, K.S. Reddy, K. Sreenath, K. Mukkanti, G.S. Reddy, Preparation of optically pure Esomeprazole and its related salt, *Organic Process Research & Development*, **10**(1), 33–35 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1021/op049779d>

63. C.R. Elati, P.J. Wankawala, S.R. Chalamala, N.G. Kolla, S. Gangula, H. Vurimidi, S. Venkataraman, V.T. Mathad, Polymorphic study of Donopezil hydrobromide, *Indian Journal of Chemistry -Section B*, **44**(6), 1231–1235 (2005). URL: <https://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/9114/1/IJCB%2044B%286%29%201231-1235.pdf>
64. W. Du, Q. Yin, J. Gong, Y. Bao, X. Zhang, X. Sun, S. Ding, C. Xie, M. Zhang, H. Hao, Effects of solvent on polymorph formation and nucleation of Prasugrel Hydrochloride, *Crystal Growth & Design*, **14**(9), 4519–4525 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1021/cg5006067>
65. B.P. Chekal, J. Ewers, S.M. Guinness, N.D. Ide, K.R. Leeman, R.J. Post, A.M. Rane, K. Sutherland, K. Wang, M. Webster, M.G.J. Withbroe, J. Draper, D. Lynch, M. McAuliffe, J. Keane, Palbociclib commercial manufacturing process development. Part III. Deprotection followed by crystallization for API particle control, *Organic Process Research & Development*, **20**(7), 1217–1226 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00071>
66. H.S.P. Chawla, A.M. Patel, A.S. Chowdhary, V.P. Joshi, M.P. Patel, Process for the manufacture of montelukast sodium, US Patent Application Publication US 2009/0182148 A1, 2009. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/18/c9/d1/cff81ef1807d09/US20090281323A1.pdf>
67. A. Halama, J. Jirman, O. Bouskova, P. Gibala, K. Jarrah, Improved process for the preparation of Montelukast: development of an efficient synthesis, identification of critical impurities and degradants, *Organic Process Research & Development*, **14**(2), 425–431 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1021/op900311z>
68. H. Ren, C.A. Strulson, G. Humprey, R. Xiang, G. Li, D.R. Gauthier, K. Maloney, Potassium isopropyl xanthate (IX): an ultra-efficient palladium scavenger, *Green Chemistry*, **19**, 4002–4006 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1039/C7GC01765K>
69. T. Wang, L.-D. Du, D.-j. Wan, X. Li, X.-Z. Chen, G.-F. Wu, Use of lipase catalytic resolution in the preparation of ethyl (2S,5R)-5-((Benzyloxy)amino)piperidine-2-carboxylate, a key intermediate of the B-lactamase inhibitor Avibactam, *Organic Process Research & Development*, **22**(12), 1738–1744 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00173>

70. M.M.A. El Azziz, A.G. Melad, A.S. Ashour, Grindstone neutralization reaction for the preparation of various salts of carboxylic acids, *Bioorganic & Organic Chemistry*, **3**(2), 31–36 (2019). URL: <https://medcraveonline.com/MOJBOC/MOJBOC-03-00095.pdf>
71. B.M. Collman, J.M. Miller, C. Seadeek, J.A. Stambek, A.C. Blackburn, Comparison of a rational vs high throughput approach for rapid salt screening and selection, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **39**(1), 29–38 (2013). Doi: <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.656272>
72. X. Linghu, N. Wong, H. Iding, V. Jost, H. Zhang, S.G. Koenig, C.G. Sowell, F. Gosselin, Development of a practical synthesis of ERK inhibitor GDC-0994, *Organic Process Research & Development*, **21**(3), 387–398 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00006>
73. X. Shi, H. Chang, M. Grohmann, W.F. Kiesman, D.-I.A. Kwok, Process development of an N-benzylated chloropurine at the kilogram scale, *Organic Process Research & Development*, **19**(3), 437–443 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1021/op5003903>
74. C.M. Brandel, J.W.B. Cooke, R.A.J. Horan, F.P. Mallet, D.R. Stevens, Optimization of the preparation of (*R*)-3,5-bis(trifluoromethyl)- α -methyl-*N*-methylbenzylamine L-(-)-malic acid salt through classical resolution, *Organic Process Research & Development*, **19**(12), 1954–1965 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00283>
75. T.A. Martinot, B.C. Austad, A. Coté, K.M. Depew, D. Genov, L. Grenier, J. Helble, A. Lescarbeiu, S. Nair, M. Trudeau, P. White, L.-N. Yu, A design of experiments approach to a robust final deprotection and reactive crystallization of IPI-926, a novel hedgehog pathway inhibitor, *Organic Process Research & Development*, **19**(11), 1693–1702 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00214>
76. M.S.H. Mithou, S. Economidou, V. Trivedi, S. Bhatt, D. Douroumis, Advanced methodologies for pharmaceutical salt synthesis, *Crystal Growth & Design*, **21**(2), 1358–1374 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c01427>
77. R. Hilfiker, Relevance of solid-state properties for pharmaceutical products, in: R. Hilfiker (editor), *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, Wiley-VCH, Germany, 2006. Ch. 1, p 2.

78. D. Giron, Characterization of salts of drug substances, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **73**(2), 441–457 (2003). Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1025461625782>
79. G. Bruni, M. Maietta, L. Maggi, M. Bini, D. Capsoni, S. Ferrari, M. Boiocchi, V. Berbenni, C. Milanese, A. Marini, Pherphenazine-fumaric acid salts with improved solubility: preparation physico-chemical characterization and *in vitro* dissolution, *CrystEngComm*, **14**, 6035–6044 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1039/C2CE25846C>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

J.C. Ortiz-Lara, Organic salts as a tool for pharmaceutical ingredient purification: Bibliographic review, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 184-218 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.112981>

Preferential solvation of triclocarban in *N*-methyl-2-pyrrolidone + water cosolvent mixtures according to the Inverse Kirkwood-Buff Integrals (IKBI) method and correlation of solubility by means of some mathematical models

Cristhian Andrés Muñoz-Ortiz^{1,2}, Néstor Enrique Cerquera³, Jennifer Katiusca Castro Camacho⁴, Jhonny Osorio-Gallego⁵, Rossember Edén Cárdenas-Torres⁵, Mauricio Herrera⁵, Daniel Ricardo Delgado^{6*}

¹ Universidad Surcolombiana, Maestría en Ingeniería y Gestión Ambiental, Neiva, Colombia

² Sitafi Group Ingeniería S.A.A., Palermo, Huila, Colombia.

³ Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agrícola, Hidroingeniería y Desarrollo Agropecuario, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia.

⁴ Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Agroindustrial, Hidroingeniería y Desarrollo Agropecuario, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia.

⁵ Facultad de Ciencias y Humanidades, Grupo de Fisicoquímica y Análisis Matemático (Línea de Investigación en Inteligencia Artificial Aplicada), Fundación Universidad de América, Av. Circunvalar No. 20-53, Bogotá D. C., Colombia.

⁶ Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Civil, Grupo de Investigación en Ingenierías UCC-Neiva, Universidad Cooperativa de Colombia, Calle 11 No. 1-51, Neiva, Colombia.

*Corresponding author. Tel.: +571-88632800; E-mail address: danielr.delgado@campusucc.edu.co

Received: December 15, 2023

Corrected: February 5, 2024

Accepted: February 6, 2024

SUMMARY

Introduction: Solubility is an important thermodynamic property due to its role in product development, as well as the understanding of biological processes. This research aims to evaluate the preferential solvation parameter ($\delta x_{1,3}$) of the triclocarban (TCC) solubility in *N*-methyl-2-pyrrolidone + water cosolvent mixtures and to assess some correlational and predictive mathematical models of concern to the pharmaceutical industry. **Calculations:** $\delta x_{1,3}$ was determined from

experimental data following the Inverse Kirkwood-Buff Integrals model (IKBI). The mathematical models were developed using Python, and functions for each model were fitted by non-linear least squares using the libraries `scipy.optimize.curve_fit`, and `sklearn.model_selection`. **Results:** According to the $\delta x_{1,3}$ heat, TCC has preferential solvation by water in water-rich mixtures, and preferential solvation by *N*-methyl-2-pyrrolidone in intermediate and *N*-methyl-2-pyrrolidone-rich mixtures. The models Yalkowsky–Roseman–van’t Hoff, Wilson, Modified Wilson, NRTL, van’t Hoff, Apelblat, and Buchowski–Ksiazaczak λh were assessed, finding good correlations with all. Conclusions: The TCC solubility increase in *N*-methyl-2-pyrrolidone + water cosolvent mixtures with increasing *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) concentration may be related to the rise in the local mole fraction ($x_{1,3}^L$) of NMP in the TCC solvation sphere. Regarding the mathematical models, the Yalkowsky–Roseman–van’t Hoff model can be considered the most versatile due to its capability estimate solubility data as a function of both temperature and cosolvent composition, given a limited range of experimental data.

Keywords: Triclocarban, inverse Kirkwood-Buff integrals, IKBI, preferential solvation, mathematical assessment.

RESUMEN

Solvatación preferencial de triclocarbán en mezclas de cosolventes de *N*-metil-2-pirrolidona + agua según el método de la integrales inversas de Kirkwood-Buff y correlación de solubilidad mediante algunos modelos matemáticos

Introducción: La solubilidad es una de las propiedades termodinámicas de mayor importancia debido a su relación en desarrollo de productos como en la elucidación de procesos biológicos. El objetivo del presente trabajo de investigación es determinar y evaluar el parámetro de solvatación preferencial ($\delta x_{1,3}$) de la solubilidad del triclocarbán (TCC) en mezclas cosolventes *N*-metil-2-pirrolidona + agua, además de desafiar algunos modelos matemáticos de carácter correlacional y predictivo de interés para la industria farmacéutica. **Cálculos:** A partir de datos experimentales se determinó $\delta x_{1,3}$ de acuerdo con el modelo de integrales inversas de Kirkwood-Buff. Los modelos matemáticos fueron desarrollados con Python y las funciones de cada modelo se ajustaron mediante mínimos cuadrados no lineales utilizando las bibliotecas `scipy.optimize.curve_fit` y `sklearn.model_selection`. **Resultados:** De acuerdo con los valores del $\delta x_{1,3}$ el TCC se solvata preferencialmente por el agua en

mezclas ricas en agua y en mezclas intermedias y ricas en *N*-metil-2-pirrolidona es solvatado preferencialmente por la *N*-metil-2-pirrolidona. Se evaluaron los modelos de Yalkowsky–Roseman–van’t Hoff, Wilson, Wilson Modificado, NRTL, van’t Hoff, Apelblat y Buchowski–Ksiazczak λh , obteniendo buenas correlaciones con todos ellos. **Conclusiones:** El incremento de la solubilidad del TCC en mezclas cosolventes *N*-metil-2-pirrolidona + agua, al incrementar la concentración de *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) puede estar relacionada con el incremento de la fracción molar local ($x_{1,3}^L$) de NMP en la esfera de solvatación del TCC, en cuanto a los modelos matemáticos el modelo de Yalkowsky–Roseman–van’t Hoff, puede definirse como el modelo más versátil al tener la capacidad de calcular datos de solubilidad en función tanto de la temperatura como de la composición cosolventes con un excelente grado de precisión, el cual fue desarrollado a partir de un número limitado de datos experimentales.

Palabras clave: Triclocarbán, integrales inversas de Kirkwood-Buff, IKBI, solvatación preferencial, análisis matemático.

RESUMO

Solvatação preferencial de triclocarban em misturas de *N*-metil-2-pirrolidona + água cosolvente de acordo com o método da integrais inversas da Kirkwood-Buff e correlação de solubilidade por meio de alguns modelos matemáticos

Introdução: A solubilidade é uma importante propriedade termodinâmica devido ao seu papel no desenvolvimento de produtos, bem como na compreensão de processos biológicos. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar o parâmetro de solvatação preferencial ($\partial x_{1,3}$) da solubilidade do triclocarban (TCC) em misturas de co-solventes *N*-metil-2-pirrolidona + água e avaliar alguns modelos matemáticos correlacionais e preditivos de interesse para a indústria farmacêutica. **Cálculos:** $\partial x_{1,3}$ foi determinado a partir de dados experimentais seguindo o modelo da integrais inversas da Kirkwood-Buff. Os modelos matemáticos foram desenvolvidos em Python, e as funções de cada modelo foram ajustadas por mínimos quadrados não lineares usando as bibliotecas `scipy.optimize.curve_fit` e `sklearn.model_selection`. **Resultados:** De acordo com o calor $\partial x_{1,3}$, o TCC possui solvatação preferencial por água em misturas ricas em água, e solvatação preferencial por *N*-metil-2-pirrolidona em misturas intermediárias e ricas em *N*-metil-2-pirrolidona. Os modelos Yalkowsky–Roseman–van’t Hoff, Wilson, Wilson modificado, NRTL, van’t Hoff, Apelblat e

Buchowski–Ksiazaczak λh foram avaliados, encontrando boas correlações com todos. Conclusões: O aumento da solubilidade do TCC em misturas de cosolventes de *N*-metil-2-pirrolidona + água com o aumento da concentração de *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) pode estar relacionado ao aumento na fração molar local ($x_{1,3}^L$) de NMP em a esfera de solvatação do TCC. Em relação aos modelos matemáticos, o modelo Yalkowsky–Roseman–van’t Hoff pode ser considerado o mais versátil devido à sua capacidade de estimar dados de solubilidade em função da temperatura e da composição do cosolvente, dada uma gama limitada de dados experimentais.

Palavras-chave: Triclocarban, integrais inversas de Kirkwood-Buff, IKBI, solvatação preferencial, avaliação matemática.

INTRODUCTION

Triclocarban (5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol; abbreviated TCC hereafter; Figure 1) is a broad-spectrum antimicrobial agent [1]. Although TCC was initially developed exclusively for medical use due to its antimicrobial properties, it is currently included in more than 2000 commodities, from soaps, toothpaste, detergents, and textiles to construction products and plastics [2]. Due to the potential endocrine-disrupting effect and bacterial resistance associated with this drug, the US Food and Drug Administration (FDA) banned the use of the drug in personal care products and over-the-counter medicines. Despite restrictions, many products still incorporate TCC [3, 4], and consequently, it is discharged into the environment mostly through wastewater, affecting a variety of ecosystems and becoming a public health issue as it generates antimicrobial resistance, among other significant environmental problems [5, 6].

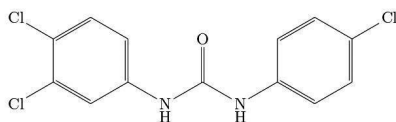


Figure 1. Molecular structure of triclocarban.

Solubility is one of the main physicochemical properties, as it is crucial in industrial processes such as crystallization, purification, pre-formulation, formulation, and quantification [7, 8]; pharmacological processes such as pharmacokinetics and pharmacodynamics; and environmental processes such as biotoxicity assessment, bioadsorption, bioaccumulation, among others [9-11].

The TCC solubility has been studied in different organic solvents [12, 13], and some cosolvent mixtures such as (1,4-dioxane + water) [14, 15], (ethanol + propylene glycol) [16], (cyclohexane + 1,4-dioxane) [17] and (ethylene glycol + water) [18].

Thermodynamic analyses of the solution process are valuable to rationalizing the solubility results since they allow the understanding of the possible molecular phenomena occurring in the process [19, 20]. As a complement, preferential solvation studies permit the analysis of the local cosolvent composition of the solvation sphere [21-25]. Another field related to solubility studies is mathematical modeling, which is especially interesting for the industry since it offers computational tools that allow reducing experimental tests or calculating solubility data under other than experimental conditions [26-29].

In this context, this research aims to evaluate the preferential solvation of TCC in *N*-methyl-2-pyrrolidone + water mixtures ($\{ \text{NMP (1)} + \text{W (2)} \}$) and to assess some predictive and correlational mathematical models.

RESULTS AND DISCUSSION

The preferential solvation parameter and the mathematical models were computed from the solubility data reported by Caviedes-Rubio *et al.* [30], the preferential solvation parameter and some mathematical models were calculated or challenged. Figure 2 plots the solubility of TCC as a function of the NMP mass fraction, where is observed a positive cosolvent effect of the NMP, especially in NMP-rich mixtures.

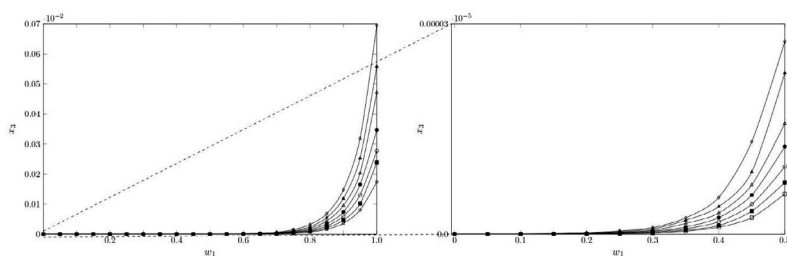


Figure 2. Mole fraction of TCC depending on the mass fraction of NMP in the $\{ \text{NMP (1)} + \text{W (2)} \}$ mixtures free of TCC. $\bullet$: 288.15 K; $\circ$: 293.15 K; $\triangle$: 298.15 K; $\blacktriangle$: 303.15 K; $\square$: 308.15 K; $\blacksquare$: 313.15 K; $\boxtimes$: 318.15 K.

Preferential solvation

The solvation sphere of the TCC molecule in each of the cosolvent mixtures can be evaluated from the equations of the IKBI model [21, 22, 31, 32].

$$\delta x_{1,3} = x_1 x_2 (G_{1,3} - G_{2,3}) [x_1 G_{1,3} + x_2 G_{2,3} + V_{cor}]^{-1} \quad (1)$$

$$G_{1,3} = RT\kappa_T - V_3 + x_2 V_2 DQ^{-1} \quad (2)$$

$$G_{1,3} = RT\kappa_T - V_3 + x_2 V_2 DQ^{-1} \quad (3)$$

$$\kappa_{T(1+2)} = x_1 \kappa_1 + x_2 \kappa_2 \quad (4)$$

$$V_1 = V + x_2 \frac{\partial V}{\partial x_1} \quad (5)$$

$$V_2 = V + x_1 \frac{\partial V}{\partial x_2} \quad (6)$$

$$V_{cor} = 2522.5 \left[r_3 + 0.1363 \sqrt{x_1^L V_1 + x_2^L V_2} - 0.085 \right]^3 \quad (7)$$

$$x_1^L = \delta x_{1,3} + x_1 \quad (8)$$

$$D = \frac{\partial \Delta_{tr} G_{2 \rightarrow 1+2}^0}{\partial x_1} \quad (9)$$

$$Q = RT + x_1 x_2 \left(\frac{\partial^2 G_{1,2}^E}{\partial x_1^2} \right) \quad (10)$$

Here $G_{1,3}$ and $G_{2,3}$ are the Kirkwood–Buff integrals (in $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}$) obtained from the thermodynamic data in equations 2 and 3, and V_{cor} is the correlation volume around TCC where preferential solvation occurs. In equations 2 and 3 κ_T is the isothermal compressibility of the mixtures (in GPa^{-1}), V_3 is the partial molar volume of the solute ($206.26 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}$ [13]), and V_1 and V_2 are the partial molar volume of the solvents (in $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}$), while D and Q (in $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, as is RT) are given in equations 9 and 10. The

compressibility is given to sufficient approximation as the linear expression equation 4 and the partial molar volumes are calculated from the experimental data of the density of the mixtures free of solute through equations 5 and 6. Eq. 7 requires iteration since it depends on the local mole fractions given by equations 1 and 8.

Parameter D is calculated from the TCC Gibbs energy of transfer from the water to each of the cosolvent and neat organic solvent mixtures (Figure 3).

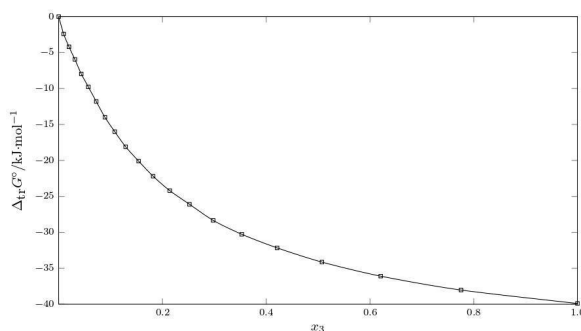


Figure 3. Gibbs energy of transfer of TCC (3) from neat water (2) to {NMP (1) + W (2)} mixtures at 298.15 K

Equation 11 describes the trends of the TCC Gibbs energy of transfer in each of the cosolvent mixtures, from where D is calculated as the first polynomial derivative, with $r^2=1.0$.

$$\Delta G_{3,2 \rightarrow 1+2}^0 = RT \ln(x_{3,2}/x_{3,1+2}) = -253.9x_1^5 + 758.2x_1^4 - 889.3x_1^3 + 538.3x_1^2 - 192.9x_1 - 0.409 \quad (11)$$

Some data necessary for the model development were taken from the literature to calculate the preferential solvation parameter (Eq. 1). The isothermal compressibility of the mixtures was calculated from the compressibility of the neat solvents (Eq. 4) by using κT of NMP as 0.620 GPa^{-1} , and κT of water as 0.457 GPa^{-1} [33]; $V_3 = 206.26 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ [14]. The partial molar volume of both solvents (water and NMP), necessary for the calculation of the inverse Kirkwood-Buff integrals (Equations 2 and 3), were taken from literature [34]. r_3 , necessary to compute V_{cor} (Eq. 7) was assumed as 0.434 nm [14]; the excess Gibbs energy for the {NMP (1) + water (2)} mixtures free of TCC, necessary for the calculation of Q (Eq. 10), was calculated from the equation and coefficients reported by Marcus [35]. Other values, such as D , were calculated from the experimental solubility data according to Eq. (9). Table 1 presents the data of the solvation parameters and some other parameters required to develop the IKBI model.

Table 1. Some properties associated with preferential solvation of TCC (3) in {NMP (1) + W (2)} mixtures at 298.15 K.

x_1^a	$D /$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\widehat{Q}^b /$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$RT\cdot xT^b /$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$V_1^b /$ $\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$	$V_2^b /$ $\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$	$G_{1,3} /$ $\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$	$G_{2,3} /$ $\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$	$V_{\text{cor}} /$ $\text{cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$	$x_{1,3}^T$	$100\cdot\delta x_{1,3}$
0.00	-192.87	2.479	1.133	89.90	18.09	-1612.6	-205.1	890.8	0.000	0.00
0.05	-145.34	2.263	1.153	90.89	18.07	-1307.6	-497.0	---	---	---
0.10	-108.98	2.252	1.173	91.77	18.00	-989.0	-649.2	---	---	---
0.15	-81.81	2.357	1.193	92.55	17.89	-732.9	-686.9	1121.6	0.136	-1.37
0.20	-62.03	2.513	1.214	93.25	17.74	-555.3	-665.4	1266.4	0.228	2.83
0.25	-48.02	2.670	1.234	93.85	17.56	-441.9	-627.0	1366.5	0.294	4.42
0.30	-38.38	2.800	1.254	94.38	17.37	-371.7	-593.1	1450.2	0.350	5.04
0.35	-31.88	2.887	1.274	94.82	17.15	-328.1	-571.4	1527.2	0.403	5.32
0.40	-27.47	2.925	1.295	95.20	16.92	-300.3	-562.5	1601.8	0.455	5.50
0.45	-24.31	2.919	1.315	95.52	16.69	-281.4	-562.9	1674.6	0.506	5.63
0.50	-21.74	2.881	1.335	95.78	16.46	-267.0	-566.3	1744.8	0.556	5.63
0.55	-19.30	2.826	1.355	95.98	16.23	-254.8	-565.5	1811.0	0.604	5.43
0.60	-16.72	2.769	1.375	96.14	16.01	-243.6	-553.2	1872.7	0.649	4.94
0.65	-13.90	2.725	1.396	96.26	15.82	-233.1	-524.1	1929.9	0.692	4.15
0.70	-10.96	2.704	1.416	96.35	15.64	-223.9	-478.2	1983.9	0.732	3.17
0.75	-8.18	2.710	1.436	96.40	15.49	-216.5	-423.2	2037.3	0.772	2.19
0.80	-6.06	2.737	1.456	96.44	15.38	-211.6	-375.7	2093.1	0.814	1.42
0.85	-5.27	2.769	1.476	96.45	15.31	-209.2	-360.9	2152.8	0.860	1.01
0.90	-6.68	2.773	1.497	96.46	15.29	-208.4	-413.9	2216.5	0.909	0.93
0.95	-11.34	2.699	1.517	96.45	15.32	-208.0	-589.9	2279.6	0.959	0.88
1.00	-20.51	2.479	1.537	96.45	15.40	-204.7	-1002.7	2331.6	1.000	0.00

^a x_1 is the mole fraction of NMP (1) in the {NMP (1) + W (2)} mixtures free of TCC (3).

^b From Nozohouri *et al.* [34].

According to the $\delta x_{1,3}$ analysis (Figure 4), from neat water to $x_1 = 0.15$, the correlation volume calculations are not possible by iteration because the equations do not converge, yielding inconsistent data since takes negative values (Figure 5) when limited only to values between 0 and 1, even if a trend can be identified. Therefore, it can be inferred that TCC has preferential solvation by water within this range of cosolvent composition. The hydrophobic hydration around the non-polar groups of TCC may contribute to lowering the net $\delta x_{1,3}$ to negative values in these water-rich mixtures [36-40]. From this cosolvent composition ($x_1 = 0.15$) up to neat NMP, $\delta x_{1,3}$ exhibits positive values indicating preferential solvation by NMP.

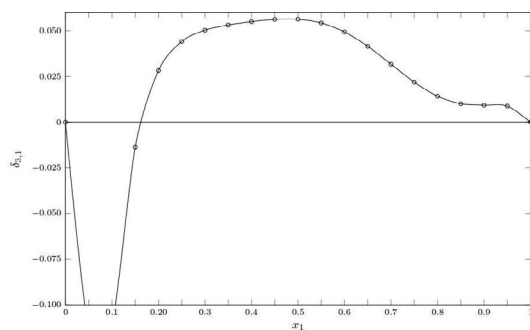


Figure 4. Preferential solvation parameters of TCC in {NMP (1) + W (2)} mixtures at 298.15 K.

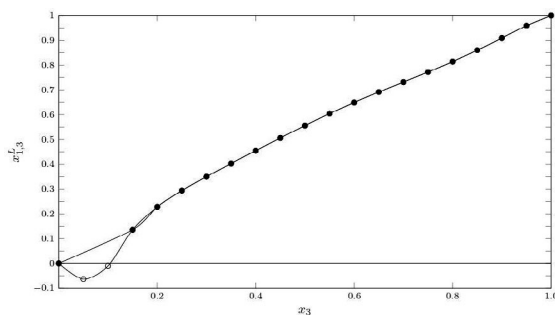


Figure 5. Local mole fraction of NMP (1) in the environment near to TCC in {NMP (1) + W (2)} mixtures at 298.15 K.

In water-rich cosolvent mixtures, the TCC behaves as a Lewis base against water since the Kamlet-Taft parameter β is 0.14 for water and 0.754 ± 0.019 for the NMP [41]. On the other hand, in intermediate and NMP-rich cosolvent mixtures, where the TCC is preferentially solvated by NMP, the TCC act as a Lewis acid due to the acid hydrogen of the -NH- groups.

Mathematical Assessment of Solubility

One of the most versatile tools for process optimization is mathematical modeling, which allows making approximations under different conditions than experimental ones [42, 43].

Mathematical models to correlate drug solubility in cosolvent systems can be classified into two groups: the models that work as a function of the cosolvent composition and the models that work as a function of temperature. In the former, the most used models

are Yalkowsky–Roseman–van’t Hoff [44, 45], Wilson [46], Modified Wilson [47], NRTL [46], and Extended Hildebrand [28, 48, 49]. In the latter, the most used models are [26, 50], Apelblat [51], Buchowski–Ksiazczak λh [52, 53] and van’t Hoff–Yaws model [54]. The latter models have a significant predictive potential whenever the data to predict are to interpolate.

Hence, the experimental solubility data [30] were correlated with the models Yalkowsky–Roseman–van’t Hoff (Eq. 12), van’t Hoff (Eq. 13), Apelblat (Eq. 14), Buchowski–Ksiazczak λh (Eq. 15), van’t Hoff–Yaws (Eq. 16), NRTL (Eq. 17), Wilson (Eq. 18), and Modified Wilson (Eq. 19).

$$\ln x_{3,1+2} = \left[w_1 \left(A + \frac{B}{T} \right) + w_2 \left(C + \frac{D}{T} \right) \right] \quad (12)$$

$$\ln x_{3,1+2} = A + BT^{-1} \quad (13)$$

$$\ln x_{3,1+2} = A + BT^{-1} + C \ln T \quad (14)$$

$$\ln [1 + \lambda(1 - x_3)x_3] = \lambda h(T^{-1} - T_m^{-1}) \quad (15)$$

$$\ln x_{3,1+2} = A + BT^{-1} + CT^{-2} \quad (16)$$

$$\ln x_{3,1+2} = 1 - w_1(1 + \ln x_{3,1})(w_1 + w_2\lambda_{12})^{-1} - w_2(1 + \ln x_{3,2})(w_2 + w_1\lambda_{21})^{-1} \quad (17)$$

Here, the parameters A , B , C , D , λ , and h are coefficients for each of the models; T is the temperature (in K); $x_{3,1+2}$ is the solubility of TCC in the cosolvent mixture; $x_{3,1}$ is the TCC solubility in NMP; $x_{3,2}$ is the solubility of TCC in water; and w_1 is the mass fraction of NMP in the solvent mixture {NMP (1) + W (2)} free of solute (3).

$$\begin{aligned} \ln \gamma_3 = & (x_2\tau_{23}G_{23} + x_1\tau_{13}G_{13})(x_3 + x_2G_{23} + x_3G_{13})^{-1} - x_3(x_2\tau_{23}G_{23} + x_1\tau_{13}G_{13})(x_3 + \\ & x_2G_{23} + x_3G_{13})^{-2} + x_2G_{32}(x_3G_{32} + x_2 + x_1G_{12})^{-1}[\tau_{32} - (x_3\tau_{32}G_{32} + x_1\tau_{12}G_{12})(x_3G_{32} + \\ & x_2 + x_1G_{12})^{-1}] + x_1G_{31}(x_3G_{31} + x_2G_{21} + x_1)^{-1}[\tau_{31} - (x_3\tau_{31}G_{31} + x_2\tau_{21}G_{21})(x_3G_{31} + \\ & x_2G_{31} + x_1)^{-1}] \end{aligned} \quad (18)$$

$$\ln \gamma_3 = 1 - \ln \ln (x_3 + x_2 A_{32} + x_1 A_{31}) - [(x_3(x_3 + x_2 A_{32} + x_1 A_{31})^{-1}) + (x_2 A_{23}(x_3 A_{23} + x_2 + x_1 A_{21})^{-1}) + (x_1 A_{13}(x_3 A_{13} + x_2 A_{12} + x_1)^{-1})] \quad (19)$$

Where γ_3 is the activity parameter of TCC; and τ , G and A are model parameters.

Regarding the NRTL model, G is a dimensionless interaction parameter, which depends on the energy interaction parameter, g , and the nonrandomness factor, α . The NRTL model contains three parameters, but the reduction of experimental data for several binary systems indicates that α varies from 0.20 up to 0.47; when experimental data are few, α value is usually settled arbitrarily as $\alpha = 0.3$. Therefore:

$$G_{ij} = e^{(-\alpha_{ij}\tau_{ij})}; \alpha_{ij} = \alpha_{ji} = 0.3 \quad (20)$$

The mathematical models were developed using Python, and functions for each model were fitted through non-linear least squares using the `scipy.optimize.curve_fit` library [55]. To validate the fit of the models the experimental data were randomly sorted into training and test data using the `sklearn.model_selection` library [56, 57]. The fit was conducted with 60% of the experimental data, while the remaining 40% was used for validation. An exception to this approach was the Yalkowsky-Roseman-van't Hoff model since the data corresponds to pure solvents at the lowest and highest study temperatures, i.e., TCC solubility in neat water at 278.15 K and 318.15 K, and TCC solubility in neat NMP at the same temperatures. Tables 2-9 present the parameters of each of the models and their Mean Relative Difference (MRD) (Eq. 21).

$$MRD = \frac{100}{N} \sum \frac{|x_3^e - x_3^c|}{x_3^e} \quad (21)$$

Here, N is the number of solubility data points, while x_3^e and x_3^c represent the experimentally measured and calculated solubility.

Table 2. Parameters of the Yalkowsky–Roseman-van't Hoff model parameter and its corresponding MRD.

Parameter	Values
A	10.63
B	-4230.53
C	-3.56
D	-4751.56
	8.13

Table 3. Parameters of the van't Hoff model and its corresponding MRD.

W_1	A	B	MRD%
0.00	-5127.8	-2.38	6.00
0.05	-5127.6	-1.53	3.34
0.10	-5152.5	-0.72	3.60
0.15	-5211.7	0.20	0.94
0.20	-5322.0	1.38	2.51
0.25	-5410.2	2.43	3.69
0.30	-5347.2	2.98	2.28
0.35	-5222.7	3.49	3.36
0.40	-5174.9	4.10	2.09
0.45	-5047.1	4.56	3.71
0.50	-4969.8	5.13	2.69
0.55	-4862.8	5.55	2.72
0.60	-4749.2	6.01	1.00
0.65	-4736.2	6.80	2.79
0.70	-4550.8	6.99	1.32
0.75	-4496.5	7.62	1.62
0.80	-4410.2	8.10	0.68
0.85	-4321.3	8.59	0.35
0.90	-4262.2	9.17	0.00
0.95	-4235.0	9.86	0.00
1.00	-4188.1	10.49	2.53
Overall MRD			2.25

Table 4. Parameters of the Buchowski–Ksiazczak λh model and its corresponding MRD.

W_1	A	B	MRD%
0.00	0.00001	913568649	6.00
0.05	0.00001	390972442	3.33
0.10	0.00003	183266236	3.59
0.15	0.00006	82730914	0.94
0.20	0.00017	32041877	2.50
0.25	0.00040	13431986	3.69
0.30	0.00078	6817187	2.29

(Continued)

W_1	A	B	$MRD\%$
0.35	0.00166	3141589	3.36
0.40	0.00334	1549812	2.09
0.45	0.00670	752882	3.71
0.50	0.01380	359683	2.69
0.55	0.02570	188971	2.72
0.60	0.05003	94801	1.00
0.65	0.11326	41762	2.78
0.70	0.19494	23312	1.32
0.75	0.40503	11087	1.60
0.80	0.77909	5658	0.68
0.85	1.51958	2847	0.36
0.90	3.13912	1365	0.04
0.95	7.02004	612	0.11
1.00	16.85140	258	2.58
Overall MRD			2.26

Table 5. Parameters of the Apelblat model and its corresponding MRD.

W_1	A	B	C	$MRD\%$
0.00	-80.6	-1665.3	11.7	6.16
0.05	-731.3	27925.3	108.6	4.02
0.10	-314.3	9066.0	46.7	3.07
0.15	3.9	-5353.7	-0.56	0.87
0.20	-274.9	7160.8	41.1	2.02
0.25	176.0	-13292.9	-25.8	3.82
0.30	327.6	-19994.6	-48.3	1.38
0.35	612.4	-32827.0	-90.6	4.80
0.40	-52.9	-2583.7	8.47	1.94
0.45	-762.6	29706.7	114.2	4.66
0.50	-81.7	-1081.0	12.9	2.70
0.55	-16.4	-3852.3	3.25	2.64
0.60	23.4	-5527.5	-2.60	1.04
0.65	-261.3	7378.9	39.9	2.22
0.70	18.4	-5035.1	-1.72	1.44
0.75	-338.2	11147.6	51.5	1.40
0.80	-132.1	1936.6	20.9	0.81
0.85	-65.4	-973.1	11.0	0.30

(Continued)

W_1	A	B	C	$MRD\%$
0.90	9.2	-4263.9	0.01	0.00
0.95	10.4	-4260.6	-0.08	0.00
1.00	-21.0	-2758.6	4.68	2.55
Overall MRD				2.28

Table 6. Parameters of the van't Hoff-Yaws model and its corresponding MRD.

W_1	A	B	C	$MRD\%$
0.00	4.91	-9476.6	647836.2	6.10
0.05	52.3	-37892.0	4981229.3	4.08
0.10	22.3	-19169.8	2134242.9	3.07
0.15	-0.30	-4933.1	-38098.8	0.87
0.20	22.2	-17993.5	1921841.5	2.04
0.25	-10.1	2234.9	-1165925.7	3.83
0.30	-21.6	9532.8	-2252899.8	1.40
0.35	-41.1	21943.8	-4135104.1	4.82
0.40	8.17	-7664.5	380483.3	1.95
0.45	61.0	-39409.7	5225825.2	4.72
0.50	12.3	-9266.2	645959.9	2.66
0.55	7.05	-5792.6	144533.9	2.64
0.60	4.56	-3883.7	-129734.7	1.04
0.65	26.9	-16942.5	1851319.2	2.21
0.70	5.73	-3818.6	-105450.2	1.42
0.75	33.2	-20055.3	2362329.4	1.42
0.80	18.4	-10686.3	953561.0	0.82
0.85	14.1	-7651.3	505463.1	0.30
0.90	9.17	-4260.5	-258.6	0.00
0.95	9.82	-4209.2	-3906.0	0.00
1.00	13.0	-5689.7	228991.6	2.56
Overall MRD				2.28

Table 7. Parameters of the NRTL model and its corresponding MRD.

T	$\tau(1.2)$	$\tau(1.3)$	$\tau(2.1)$	$\tau(2.3)$	$\tau(3.1)$	$\tau(3.2)$	MRD
288.15	-7.38	7.73	4.09	17.15	-3.12	-1.72	0.06
293.15	-7.77	7.48	4.03	17.59	-3.07	-1.91	0.14
298.15	-8.10	7.37	4.08	18.14	-3.02	-2.10	0.04
303.15	-8.07	7.14	4.11	17.80	-2.97	-2.02	0.02
308.15	-6.28	6.61	4.15	13.32	-2.93	0.58	0.06
313.15	-6.25	6.52	4.24	13.23	-2.89	0.58	0.09
318.15	-0.09	5.96	3.44	12.47	-2.89	3.40	0.75
Overall MRD							0.17

Table 8. Parameters of the Wilson model and its corresponding MRD

T	$\Lambda(1.2)$	$\Lambda(1.3)$	$\Lambda(2.1)$	$\Lambda(2.3)$	$\Lambda(3.1)$	$\Lambda(3.2)$	MRD
288.15	0.000	0.000	5.789	0.683	6.438	1.675	0.000
293.15	0.000	0.000	5.625	0.636	6.488	1.875	0.000
298.15	0.000	0.000	5.466	0.695	6.437	1.769	0.001
303.15	0.000	0.000	5.308	0.696	6.499	1.852	0.001
308.15	0.000	0.000	5.151	0.630	6.780	2.217	0.001
313.15	0.000	0.000	4.999	0.657	6.916	2.261	0.001
318.15	0.000	0.000	4.849	0.637	7.287	2.553	0.001
Overall MRD							0.001

Table 9. Parameters of the Modified Wilson model and its corresponding MRD.

T	λ_{12}	λ_{21}	MRD
288.15	0.98	1.02	13.35
293.15	1.03	0.97	7.93
298.15	1.98	0.93	3.53
303.15	-0.03	1.24	34.25
308.15	1.02	0.98	5.75
313.15	0.98	1.02	6.47
318.15	0.98	1.02	5.25
Overall MRD			10.93

The two models with higher deviations from the experimental data are the Modified Wilson and Yalkowsky-Roseman-van't Hoff (YRvH) models with MRD of 10% and 8%, respectively. However, based on the modeling principle of using the least number of experimental data, the best model was the YRvH. The YRvH model parameters were calculated from only four experimental data and would allow maximum reduction of tests for a wide range of temperatures and cosolvent compositions. Regarding the MRD results, the best models were Wilson (MRD%=0.001%) and NRTL (MRD%=0.17%).

When evaluating the performance of the models (Table 10), it was observed that all correlation coefficients are approximately 1.0 (Figure 6), t -values are high, the F_{Critical} values are low, and p -values are below 0.001. This statistical analysis indicates that the correlation and model constants are meaningful, and the increase in the number of parameters in the models does not represent a significant advantage when predicting solubility. As mentioned before, one of the most versatile models due to the reduced number of experimental data required to calculate its parameters and its great predictive power is the Yalkowsky-Roseman-van't Hoff model. In addition, this model allows the calculation of solubility as a function of both cosolvent composition and temperature, unlike the other models evaluated.

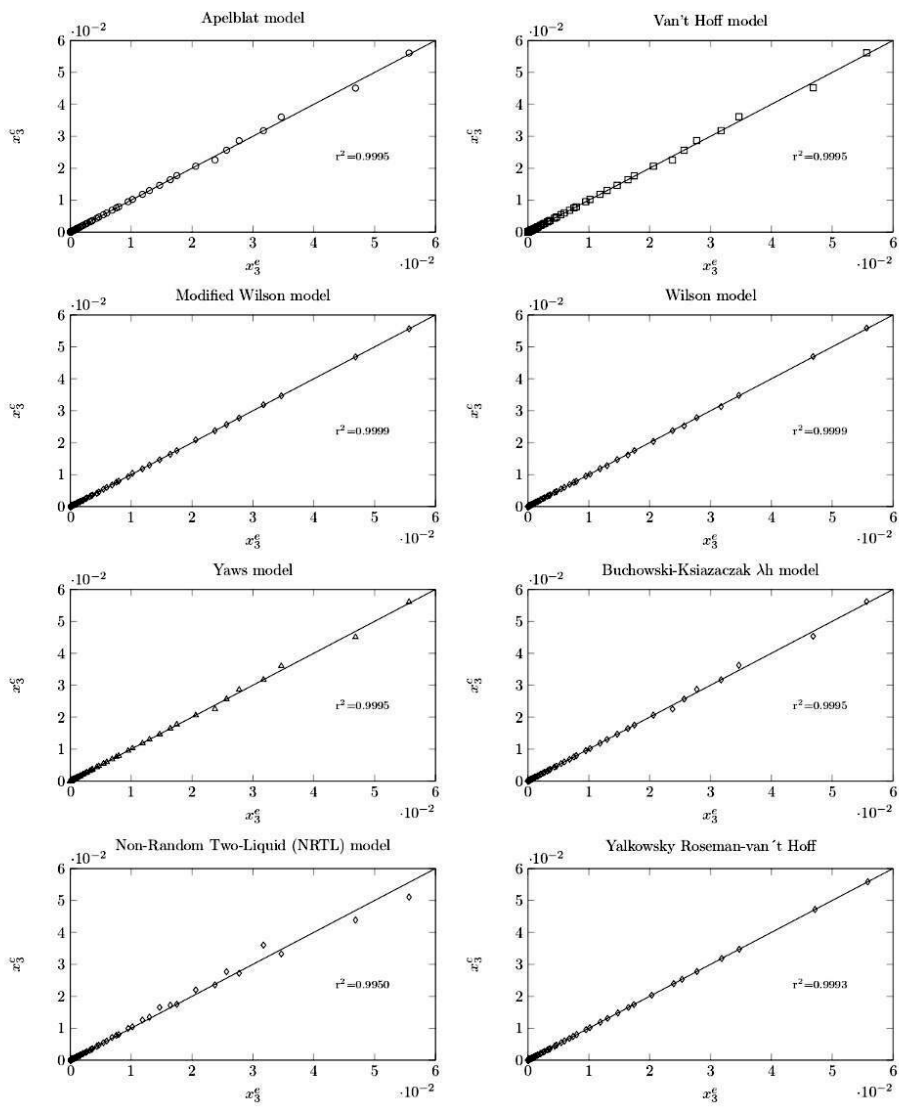


Figure 6. Experimental solubility data versus predicted solubility of TCC (3) in {NMP (1) + W (2)} and cosolvent mixtures.

Table 10. Statistical analysis of the correlation for all mathematical models.

Model	Correlation coefficient	F	$F_{critical}$	p
Apelblat	0.9995	283485.9	$4.2 \cdot 10^{-239}$	$\ll 0.001$
Modified Wilson	1.0000	6416467.2	0.00	$\ll 0.001$
NRTL	0.9950	28907.9	$7.5 \cdot 10^{-168}$	$\ll 0.001$
van't Hoff	0.9995	281565.6	$6.9 \cdot 10^{-239}$	$\ll 0.001$
Wilson	1.0000	3048266.1	0.00	$\ll 0.001$
Yaws	0.9995	283653.0	$4.1 \cdot 10^{-239}$	$\ll 0.001$
Buchowski–Ksiazczak	0.9995	272478.9	$7.3 \cdot 10^{-238}$	$\ll 0.001$
Yalkowsky–Roseman–van't Hoff	0.9993	216725.5	$1.0 \cdot 10^{-230}$	$\ll 0.001$

CONCLUSIONS

The TCC solubility in cosolvent mixtures {NMP (1) + W (2)} is strongly controlled by the cosolvent composition. According to the solvation parameter, this increase in the solubility of TCC when increasing the NMP concentration is due to a higher affinity between TCC and NMP. Furthermore, the low solubility of TCC in neat water and water-rich mixtures may be due to a hydrophobic hydration effect around the non-polar groups of TCC, which could also lead to free water structuring.

According to the statistical analysis, all the mathematical models implemented achieved satisfactory results. However, the Yalkowsky–Roseman–van't Hoff model was the most versatile due to its simplicity and ability to use a limited number of experimental data for its development.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. D. Zhang, S. Lu, A holistic review on triclosan and triclocarban exposure: Epidemiological outcomes, antibiotic resistance, and health risk assessment, *Science of The Total Environment*, **872**, 162114 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162114>

2. R.U. Halden, On the need and speed of regulating triclosan and triclocarban in the United States, *Environmental Sciences & Technology*, **48**(7), 3603–3611 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1021/es500495p>
3. H. Barrett, J. Sun, Y. Gong, P. Yang, C. Hao, J. Verreault, Y. Zhang, H. Peng, Triclosan is the predominant antibacterial compound in Ontario sewage sludge, *Environmental Sciences & Technology*, **56**(21), 14923–14936 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00406>
4. D. Kneis, T.U. Berendonk, S.K. Forslund, S. Hess, Antibiotic resistance genes in river biofilms: A metagenomic approach toward the identification of sources and candidate hosts, *Environmental Sciences & Technology*, **56**(21), 14913–14922 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00370>
5. S. Lu, N. Wang, S. Ma, X. Hu, L. Kang, Y. Yu, Parabens and triclosan in shellfish from Shenzhen coastal waters: Bioindication of pollution and human health risks, *Environmental Pollution*, **246**, 257–263 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.002>
6. E.M. Hartmann, R. Hickey, T. Hsu, C.M. Betancourt-Román, J. Chen, R. Schwager, J. Kline, G.Z. Brown, R.U. Halden, C. Huttenhower, J.L. Green, Antimicrobial chemicals are associated with elevated antibiotic resistance genes in the indoor dust microbiome, *Environmental Sciences & Technology*, **50**(18), 9807–9815 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00262>
7. A.N. Martin, P. Bustamante, A.H.C. Chun, *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1993.
8. A.T. Florence, D. Attwood, *Physicochemical Principles of Pharmacy: In Manufacture, Formulation and Clinical Use*, 6th ed., Pharmaceutical Press, London, 2016.
9. E. Hart, D. Grover, H. Zettl, V. Koshevarova, S. Zhang, C. Dai, W.E. Acree Jr., I.A. Sedov, M.A. Stolov, M.H. Abraham, Abraham model correlations for solute transfer into 2-methoxyethanol from water and from the gas phase, *Journal of Molecular Liquids*, **209**, 738–744 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.05.064>

10. J.H. Blanco-Márquez, Y.A. Quigua-Medina, J.D. García-Murillo, J.K. Castro-Camacho, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, D.R. Delgado, Thermodynamic analysis and applications of the Abraham solvation parameter model in the study of the solubility of some sulfonamides, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **49**(1), 234–255 (2020). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n1.87038>
11. C.P. Ortíz, R.E. Cardenas-Torres, D.I. Caviedes-Rubio, S.D.J. Polania-Orozco, D.R. Delgado, Thermodynamic analysis and preferential solvation of sulfanilamide in different cosolvent mixtures, *Physics and Chemistry of Liquids*, **60**(1), 9–24 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319104.2021.1888382>
12. D.R. Delgado, A. Holguin, F. Martínez, Solution thermodynamics of triclosan and triclocarban in some volatile organic solvents, *Vitae*, **19**(1), 79–92 (2012). URL: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042012000100009
13. D.R. Delgado, A. Sosnik, F. Martínez, Transfer thermodynamics of triclosan from water to organic solvents with different hydrogen bonding capability, *Latin American Journal of Pharmacy*, **30**(3), 459–466 (2011). URL: http://www.latamjpharm.org/resumenes/30/3/LAJOP_30_3_1_7.pdf
14. A.C. Gaviria-Castillo, J.D. Artunduaga-Tole, J.D. Rodríguez-Rubiano, J.A. Zuñiga-Andrade, D.R. Delgado, A. Jouyban, F. Martínez, Solution thermodynamics and preferential solvation of triclocarban in {1,4-dioxane (1) + water (2)} mixtures at 298.15 K, *Physics and Chemistry of Liquids*, **57**(1), 55–56 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319104.2017.1416613>
15. D.R. Delgado, E.M. Mogollon-Waltero, C.P. Ortiz, M. Peña, O.A. Almanza, F. Martínez, A. Jouyban, Enthalpy-entropy compensation analysis of the triclocarban dissolution process in some {1,4-dioxane (1) + water (2)} mixtures, *Journal of Molecular Liquids*, **271**, 522–529 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.09.026>
16. A.R. Holguín, D.R. Delgado, F. Martínez, Thermodynamic study of the solubility of triclocarban in ethanol + propylene glycol mixtures, *Química Nova*, **35**(2), 280–285 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000200009>

17. J.J. Agredo-Collazos, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, R.E. Cardenas-Torres, D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Equilibrium solubility of triclocarban in (cyclohexane + 1,4-dioxane) mixtures: Determination, correlation, thermodynamics and preferential solvation, *Journal of Solution Chemistry*, **51**(12), 1603–1625 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1007/S10953-022-01209-4>
18. A.M. Cruz-González, M.S. Vargas-Santana, S.d.J. Polania-Orozco, C.P. Ortiz, N.E. Cerquera, F. Martínez, D.R. Delgado, A. Jouyban, W.E. Acree Jr., Thermodynamic analysis of the solubility of triclocarban in ethylene glycol + water mixtures, *Journal of Molecular Liquids*, **325**, 115222 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.115222>
19. M.A. Parra, N.E. Cerquera, C.P. Ortiz, R.E. Cárdenas-Torres, D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Solubility of ciprofloxacin in different solvents at several temperatures: Measurement, correlation, thermodynamics and Hansen solubility parameters, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **150**, 105028 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2023.105028>
20. C.P. Ortiz, R.E. Cardenas-Torres, M. Herrera, D.R. Delgado, Thermodynamic analysis of the solubility of propylparaben in acetonitrile–water cosolvent mixtures, *Sustainability*, **15**(6), 4795 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/su15064795>
21. Y. Marcus, Preferential solvation in mixed solvents, in: P.E. Smith, E. Matteoli, J.P. O'Connell (editors), *Fluctuation Theory of Solutions: Applications in Chemistry, Chemical Engineering, and Biophysics*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton (FL), 2013.
22. Y. Marcus, On the preferential solvation of drugs and PAHs in binary solvent mixtures, *Journal of Molecular Liquids*, **140**(1-3), 61–67 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2008.01.005>
23. M.A. Ruidiaz, D.R. Delgado, F. Martínez, Y. Marcus, Solubility and preferential solvation of indomethacin in 1,4-dioxane+water solvent mixtures, *Fluid Phase Equilibria*, **299**(2), 259–265 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2010.09.027>
24. A.R. Holguín, D.R. Delgado, F. Martínez, Y. Marcus, Solution thermodynamics and preferential solvation of meloxicam in propylene glycol +water mixtures, *Journal of Solution Chemistry*, **40**(12), 1987–1999 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10953-011-9769-0>

25. D.R. Delgado, A.R. Holguín, O.A. Almanza, F. Martínez, Y. Marcus, Solubility and preferential solvation of meloxicam in ethanol + water solvent mixtures, *Fluid Phase Equilibria*, **305**(1), 88–95 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.03.012>
26. C.P. Ortiz, R.E. Cardenas-Torres, M. Herrera, D.R. Delgado, Numerical analysis of sulfamerazine solubility in acetonitrile + 1-propanol cosolvent mixtures at different temperatures, *Sustainability*, **15**(8), 6596 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/su15086596>
27. D.R. Delgado, R.E. Cardenas-Torres, C.P. Ortiz, Mathematical modeling of the aqueous solubility of bioactive substances of environmental interest, *Proceedings - 2022 8th International Engineering, Sciences and Technology Conference, IESTEC 2022*, Panama, 2022. pp. 498–503. URL: <https://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=10040875>
28. D.M. Cristancho, D.R. Delgado, F. Martínez, Meloxicam solubility in ethanol+water mixtures according to the extended Hildebrand solubility approach, *Journal of Solution Chemistry*, **42**(8), 1706–1716 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10953-013-0058-y>
29. A. Torres-Cardozo, N.E. Cerquera, C.P. Ortiz, J. Osorio-Gallego, R.E. Cardenas-Torres, F. Angarita-Reina, F. Martinez, D.R. Delgado, Thermodynamic analysis of the solubility of progesterone in 1-octanol + ethanol cosolvent mixtures at different temperatures, *Alexandria Engineering Journal*, **64**, 219–235 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.08.035>
30. D.I. Cavedes-Rubio, C.P. Ortiz, F. Martinez, D.R. Delgado, Thermodynamic assessment of triclocarban dissolution process in *N*-methyl-2-pyrrolidone + water cosolvent mixtures, *Molecules*, **28**(20), 7216 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28207216>
31. Y. Marcus, Preferential solvation of drugs in binary solvent mixtures, *Pharmaceutical Analytica Acta*, **8**, 1000537 (2017). Doi: <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000537>
32. Y. Marcus, Preferential solvation in mixed solvents. 15. Mixtures of acetonitrile with organic solvents, *Journal of Chemical Thermodynamics*, **135**, 55–59 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.03.019>
33. Y. Marcus, *The properties of solvents*, John Wiley & Sons Ltd, New York, 1999.

34. S. Nozohouri, A. Shayanfar, Z.J. Cárdenas, F. Martinez, A. Jouyban, Solubility of celecoxib in *N*-methyl-2-pyrrolidone+water mixtures at various temperatures: Experimental data and thermodynamic analysis, *Korean Journal of Chemical Engineering*, **34**(5), 1435–1443 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1007/S11814-017-0028-Y>
35. Y. Marcus, *Solvent mixtures: Properties and selective solvation*, Marcel Dekker, Inc, New York, 2002.
36. D.I. Caviedes-Rubio, R.G. Sotomayor-Pino, D.R. Delgado, Solvatación preferencial de la naringina en mezclas cosolventes etanol + agua mediante el método de las integrales inversas de Kirkwood-Buff, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **44**(2), 220–235 (2015). URL: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56295>
37. D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Preferential solvation of acetaminophen in ethanol + water solvent mixtures according to the inverse Kirkwood-Buff integrals method, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **42**(2), 298–314 (2013). URL: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182013000200009
38. R.G. Sotomayor, D.R. Delgado, F. Martínez, Preferential solvation of naproxen and piroxicam in ethanol + water mixtures, *Bulgarian Chemical Communications*, **47**(2), 571–577 (2015). URL: http://www.bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_47_Number_2_2015/BCC-47-2-3556-Sotomayor-571-577.pdf
39. D.R. Delgado, O.A. Almanza, F. Martínez, M.A. Peña, A. Jouyban, W.E. Acree Jr., Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamethazine in (methanol + water) mixtures, *Journal of Chemical Thermodynamics*, **97**, 264–276 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.02.002>
40. D.R. Delgado, F. Martínez, Solution thermodynamics and preferential solvation of sulfamerazine in methanol + water mixtures, *Journal of Solution Chemistry*, **44**(2), 360–377 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10953-015-0317-1>
41. M.J. Kamlet, R.W. Taft, The solvatochromic comparison method. I. The β -scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities, *Journal of the American Chemical Society*, **98**(2), 377–383 (1976). Doi: <https://doi.org/10.1021/ja00418a009>

42. D.R. Delgado, M.Á. Peña, F. Martínez, Extended Hildebrand solubility approach applied to sulphadiazine, sulphamerazine and sulphamethazine in some {1-propanol (1) + water (2)} mixtures at 298.15 K, *Physics and Chemistry of Liquids*, **57**(3), 388–400 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1080/00319104.2018.1476976>
43. D.R. Delgado, R.E. Cardenas-Torres, C.P. Ortiz, Mathematical modeling of the aqueous solubility of bioactive substances of environmental interest, in: *Proceedings - 2022 8th International Engineering, Sciences and Technology Conference*, IESTEC 2022, Panama, 2022. pp. 498–503. URL: <https://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=10040875>
44. S.H. Yalkowsky, Solubility and solubilization in aqueous media, American Chemical Society, New York, 1999.
45. M.A. Ruidiaz, D.R. Delgado, F. Martínez, Performance of the Jouyban-Acree and Yalkowsky-Roseman models for estimating the solubility of indomethacin in ethanol+ water mixtures, *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, **35**(136), 329–336 (2011). URL: <https://repositorio.accefyn.org.co/bitstream/001/2763/1/329-336.pdf>
46. J.M. Prausnitz, Termodinámica Molecular de los Equilibrios de Fases, 3a ed., Prentice Hall, Madrid, 2000.
47. M. Barzegar-Jalali, E. Rahimpour, W.E. Acree, A. Jouyban, A global version of modified Wilson model for solubility prediction of drugs in methanol + water mixtures, *Journal of Molecular Liquids*, **269**, 609–618 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.033>
48. A. Adjei, J. Newburger, A. Martin, Extended Hildebrand approach: Solubility of caffeine in dioxane–water mixtures, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **69**(6), 659–661 (1980). Doi: <https://doi.org/10.1002/jps.2600690613>
49. J.L. Gómez, G.A. Rodríguez, D.M. Cristancho, D.R. Delgado, A. Yurquina, F. Martínez, Extended Hildebrand Solubility Approach applied to Nimodipine in PEG 400 + ethanol mixtures, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **42**(1), 103–121 (2013). URL: <http://scielo.org.co/pdf/rccqf/v42n1/v42n1a07.pdf>
50. A. Fathi-Azarbayjani, M. Abbasi, J. Vaez-Gharamaleki, A. Jouyban, Measurement and correlation of deferiprone solubility: Investigation of solubility parameter and application of van't Hoff equation and Jouyban–Acree model, *Journal of Molecular Liquids*, **215**, 339–344 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.005>

51. S.V. Blokhina, M.V. Ol'khovich, A.V. Sharapova, I.B. Levshin, G.L. Perlovich, Thermodynamic insights to solubility and lipophilicity of new bioactive hybrids triazole with thiazolopyrimidines, *Journal of Molecular Liquids*, **324**, 114662 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114662>
52. T. Jeliński, N. Bugalska, K. Koszucka, M. Przybyłek, P. Cysewski, Solubility of sulfanilamide in binary solvents containing water: Measurements and prediction using Buchowski-Ksiazczak solubility model, *Journal of Molecular Liquids*, **319**, 114342 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114342>
53. H. Buchowski, A. Ksiazczak, S. Pietrzyk, Solvent activity along a saturation line and solubility of hydrogen-bonding solids, *Journal of Physical Chemistry*, **84**(9), 975–979 (1980). Doi: <https://doi.org/10.1021/j100446a008>
54. P. Cysewski, T. Jeliński, D. Procek, A. Dratwa, Solubility of sulfanilamide and sulfacetamide in neat solvents: Measurements and interpretation using theoretical predictive models, first principle approach and artificial neural networks, *Fluid Phase Equilibria*, **529**, 112883 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2020.112883>
55. P. Virtanen, R. Gommers, T.E. Oliphant, M. Haberland, T. Reddy, D. Cournapeau, E. Burovski, P. Peterson, W. Weckesser, J. Bright, *et al.*, SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python, *Nature Methods*, **17**, 261–272 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
56. L. Buitinck, G. Louppe, M. Blondel, F. Pedregosa, A. Mueller, O. Grisel, V. Niculae, P. Prettenhofer, A. Gramfort, J. Grobler, R. Layton, J. VanderPlas, A. Joly, B. Holt, G. Varoquaux, *API Design for Machine Learning Software: Experiences from the Scikit-Learn Project*, New York, 2013. Doi: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1309.0238>
57. F. Pedregosa, V. Michel, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss, J. Vanderplas, D. Cournapeau, F. Pedregosa, G. Varoquaux, A. Gramfort, B. Thirion, O. Grisel, V. Dubourg, A. Passos, M. Brucher, M. Perrot, É. Duchesnay, Scikit-learn: Machine Learning in Python, *Journal of Machine Learning Research*, **12**, 2825–2830 (2011). URL: <https://jmlr.org/papers/volume12/pedregosa11a/pedregosa11a.pdf>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

C.A. Muñoz-Ortiz, N.E. Cerquera, J.K. Castro-Camacho, J. Osorio-Gallego, R.E. Cárdenas-Torres, M. Herrera, D.R. Delgado, Preferential solvation of triclocarban in *N*-methyl-2-pyrrolidone + water cosolvent mixtures according to the Inverse Kirkwood-Buff Integrals (IKBI) method and correlation of solubility by means of some mathematical models, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 219-243 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.111422>

Preparation and characterization of copper nanoparticles of *Schisandra chinensis* and evaluation of its antiproliferative activity

Dario A. Tinjacá ^{1a*}, Ovidio A. Almanza ^{2b}, Felix Delgado ^{3c}, Sandra Johana Morantes ^{4d},
María C. Medina ^{1e}, Paola Torres ^{1f}, Estefanía Martínez ^{1g}

¹ Universidad El Bosque, Facultad de Ciencias, Química Farmacéutica, Grupo de Investigación en Química aplicada (INQA), Semillero de Investigación SIFUB, Bogotá D.C., Colombia.

² Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Física, Grupo de Física Aplicada, Bogotá D.C., Colombia.

³ Universidad El Bosque, Vicerrectoría de Investigaciones, Grupo de Virología, Bogotá D.C., Colombia.

⁴ Universidad El Bosque, Facultad de Ciencias, Programa Química Farmacéutica, Grupo de Investigación en Química Aplicada- INQA, Bogotá D.C., Colombia.

E-mail addresses: ^a dtinjacab@unbosque.edu.co, ^b oaalmanzam@unal.edu.co,

^c delgadofelix@unbosque.edu.co, ^d smorantes@unbosque.edu.co, ^e mcmedina@unbosque.edu.co,

^f ptoresch@unbosque.edu.co, ^g emartinezqu@unbosque.edu.co

*Corresponding author.

Received: January 15, 2024

Corrected: February 6, 2024

Accepted: February 7, 2024

SUMMARY

Introduction: *Schisandra chinensis* is a plant species whose fruits have been well known for its multiple pharmacological effects. In the current work, aqueous extract of *S. chinensis* fruits is used to produce Copper nanoparticles (CuNPs) through green-synthesis method. Physical and biological essays characterized the nanoparticles obtained. **Aim:** To produce Copper nanoparticles through a green-synthesis method using the aqueous extract of *S. chinensis* fruits and to characterize this material using spectroscopic methods, including UV-Vis, FTIR (Fourier Transform Infrared Spectra), X-ray diffraction, and SEM (Scanning electron microscopy). Subsequently, the nanoparticulate material is evaluated against three tumor cell lines: A549 human lung cancer cell line (CRM-CCL-185TM), HT29 human colorectal adenocarcinoma cell line (ATCC® HTB-38TM) and MCF7 breast cancer cell line (ATCC® HTB-22TM). **Results:** Through a green-

synthesis method, Copper nanoparticles were synthesized from aqueous extract of *S. chinensis* fruits, demonstrating a spherical morphology with a size close to 26 nanometers by means of spectral methods. Furthermore, results suggest that the *S. chinensis* reduced CuNPs were able to induce mainly early apoptotic cell death in cancer cells in a concentration-dependent manner. **Conclusions:** The results proved that *S. chinensis* fruit aqueous extract could be applied for a greener synthesis of copper nanoparticles with potential anti-proliferative effect.

Keywords: *Schisandra chinensis*; material science; nanotechnology, green synthesis, copper nanoparticles, antiproliferative effects, carcinoma.

RESUMEN

preparación y caracterización de nanopartículas de cobre de *Schisandra chinensis* y evaluación de su actividad antiproliferativa

Introducción: *Schisandra chinensis* es una especie vegetal cuyos frutos han sido muy conocidos por sus múltiples efectos farmacológicos. En el trabajo actual, se utiliza extracto acuoso de frutos de *S. chinensis* para producir nanopartículas de cobre (CuNP) mediante el método de síntesis verde. Ensayos físicos y biológicos caracterizaron las nanopartículas obtenidas. **Objetivo:** producir nanopartículas de cobre mediante un método de síntesis verde utilizando el extracto acuoso de frutos de *S. chinensis* y caracterizar este material mediante métodos espectroscópicos, incluidos UV-Vis, FTIR (espectros infrarrojos por transformada de Fourier), difracción de rayos X y SEM. (Microscopía electrónica de barrido). Posteriormente, el material nanoparticulado se evalúa frente a tres líneas celulares tumorales: línea celular de cáncer de pulmón humano A549 (CRM-CCL-185TM), línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano HT29 (ATCC® HTB-38TM) y línea celular de cáncer de mama MCF7 (ATCC® HTB -22TM). **Resultados:** Mediante un método de síntesis verde, se sintetizaron nanopartículas de cobre a partir de extracto acuoso de frutos de *S. chinensis*, demostrando mediante métodos espectrales una morfología esférica con un tamaño cercano a los 26 nanómetros. Además, los resultados sugieren que las CuNP reducidas de *S. chinensis* fueron capaces de inducir principalmente la muerte celular apoptótica temprana en células cancerosas de una manera dependiente de la concentración. **Conclusiones:** Los resultados demostraron que el extracto

acuoso del fruto de *S. chinensis* podría aplicarse para una síntesis más ecológica de nanopartículas de cobre con potencial efecto antiproliferativo.

Palabras clave: *Schisandra chinensis*; ciencia material; nanotecnología, síntesis verde, nanopartículas de cobre, efectos antiproliferativos, carcinoma.

RESUMO

Preparação e caracterização de nanopartículas de cobre de *Schisandra chinensis* e avaliação de sua atividade antiproliferativa

Introdução: *Schisandra chinensis* é uma espécie vegetal cujos frutos são bastante conhecidos por seus múltiplos efeitos farmacológicos. No presente trabalho, extrato aquoso de frutos de *S. chinensis* é utilizado para produzir nanopartículas de cobre (CuNPs) através do método de síntese verde. Ensaios físicos e biológicos caracterizaram as nanopartículas obtidas. **Objetivo:** Produzir nanopartículas de cobre através de um método de síntese verde usando o extrato aquoso de frutos de *S. chinensis* e caracterizar este material usando métodos espectroscópicos, incluindo UV-Vis, FTIR (Fourier Transform Infrared Spectra), difração de raios X e MEV. (Microscopia eletrônica de varredura). Posteriormente, o material nanoparticulado é avaliado contra três linhagens de células tumorais: linhagem celular de câncer de pulmão humano A549 (CRM-CCL-185TM), linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano HT29 (ATCC® HTB-38TM) e linhagem celular de câncer de mama MCF7 (ATCC® HTB-22TM). **Resultados:** Através de um método de síntese verde, nanopartículas de cobre foram sintetizadas a partir de extrato aquoso de frutos de *S. chinensis*, demonstrando uma morfologia esférica com tamanho próximo a 26 nanômetros por meio de métodos espectrais. Além disso, os resultados sugerem que os CuNPs reduzidos de *S. chinensis* foram capazes de induzir principalmente a morte celular apoptótica precoce em células cancerosas de uma maneira dependente da concentração. **Conclusões:** Os resultados provaram que o extrato aquoso da fruta *S. chinensis* pode ser aplicado para uma síntese mais verde de nanopartículas de cobre com potencial efeito antiproliferativo.

Palavras-chave: *Schisandra chinensis*; ciência dos materiais; nanotecnologia, síntese verde, nanopartículas de cobre, efeitos antiproliferativos, carcinoma.

INTRODUCTION

The application of nanoscale materials is an emerging area of pharmaceutical nanotechnology. Nanoparticles are structures with a size extending approximately from 1 nm up to 100 nm in length exhibiting specific characteristics in distribution and morphology [1]. Synthesis of copper nanoparticles (CuNPs) is interesting for the scientific community because of the wide range of applications in pharmaceuticals, photonics, electronics, sensing and catalysis [2, 3]. CuNPs have interest due to their excellent physical and chemical properties such as high surface-to-volume ratio, thermal conductivity, as well as their capacity to penetrate cellular barriers [4]. In fact, these nanoparticles could be used in cancer diagnosis and treatment [5]. The production of metallic CuNPs with different morphologies and sizes has been realized during the last decade by using different routes [6-13]. Although various techniques including chemical and physical procedures have been developed, an alternative route is the biosynthesis of metal nanoparticles starting from plant extracts [14, 15]. The last one is a specific application of green chemistry, characterized by a more efficient and less hazardous synthesis process, being a cost-effective and eco-friendly approach. Because the control of particle size and morphology are essential characteristics for application in biomedicine, the biological approach is superior to the chemical and physical synthesis methods for metal nanoparticles [16]. Such Likewise, stabilization of copper ions using leaf or fruit extracts and characterization of resulting nanoparticles have been documented in previous studies [17, 18].

The use of vegetable extracts for the biosynthesis of metal nanoparticles is based on the observation that plants can uptake and bio-reduce metal ions from soils and solutions. Many plant species contain different types of antioxidative compounds (reductant agents) such as flavonoids, coumarins, xanthonenes, anthraquinones, and terpenoids. The phytocompound-enriched plant extracts are the principal ones involved in metal salt reduction from positive oxidation state to zero, and thus, acting as reducing agents. These substances, traditionally referred as secondary metabolites, are distributed differentially among limited taxonomic groups within the plants kingdom. For instance, a broad range of plants with high content of these metabolites, including *Allium sativum* [19], *Ocimum sanctum* L. [20], *Capparis spinosa* [21], *Citrus limon* [22], *Curcuma longa* [23], *Magnolia Kobus* [24], *Passiflora foetida* [25], *Piper retrofractum* Vahl [26], *Punica granatum* [27], *Asparagus adscendens* [28], have been used for the synthesis of CuNPs. Furthermore, some studies revealed that using plant extracts as reductant agents for the synthesis of CuNPs by the biological method exhibited anticancer potential, antiproliferative and cytotoxic activity [29-32]. Another reports about synthesis of nanoparticles or composites using fruit extracts especially utilizing flavonoids, polyphenols etc. have been reported numerous times in the past [33, 34].

Schisandra chinensis is a plant species whose fruits have been well known in Far Eastern medicine for a long time. It had been reported that the most important components of the *S. chinensis* berries are dibenzo[a,c]cyclooctadiene lignans also known as “schisandra lignans” [35], which are not easily found in other plants. Lignans are secondary metabolites that belong to the polyphenolic compounds. Moreover, some studies demonstrated that *S. chinensis* exhibits antitumor [36], anti-hepatotoxic and hepatoprotective [37, 38], anti-cancer [39], neuroprotective [40], anti-diabetic [41], and antioxidant [39, 42] properties. Formation of nanoparticles using green chemistry, characterization, effects of fruit extracts and potential application in cancer medicine using *Schisandra* genus have been discussed in prior literature [34, 43-49].

The current therapeutic agents used for cancer treatment are very costly with additional problems such as severe side effects and toxicity on non-cancerous tissues. Consequently, it is necessary to explore a new cost-effective and biocompatible therapeutic approach against cancer.

For the above-mentioned reasons, the current study was designed to prepare and characterize the biosynthesized CuNPs using a bioreduction procedure with aqueous extract of *S. chinensis* as a bioreducing agent and evaluate its antiproliferative and apoptotic effects on A549 human lung cancer cell line (CRM-CCL-185TM), HT29 human colorectal adenocarcinoma cell line (ATCC® HTB-38TM) and MCF7 breast cancer cell line (ATCC® HTB-22TM).

MATERIALS AND METHODS

Materials

The dried *S. chinensis* berries extract was obtained from Gelinna Health Center (Xi'an Greena Biotech Co., Ltd., Yantra District., Xi'an, China); copper sulphate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) used in the study was of analytical grade (Sigma-Aldrich); de-ionized and distilled water were directly obtained from our laboratory at the Universidad El Bosque, Bogotá D.C., Colombia; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) culture medium, resazurin, dimethyl sulfoxide (DMSO) and all other used reagents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich; Fetal bovine serum (FBS) and Penicillin-Streptomycin solution was obtained from Gibco® Life Technologies and Trypsin-EDTA from Lonza.

Preparation of *S. chinensis* aqueous extract

20 g of the dried *S. chinensis* berries extract was taken in a beaker along with 100 mL of de-ionized water that it is heated at 60 °C during 30 minutes under reflux condi-

tions and cooled down to room temperature. After that the solution was filtered using Whatman Grade 2 filter paper to eliminate non-soluble materials obtaining a clear solution. The filtrate was stored at 4 °C for further experiments.

Biosynthesis of copper nanoparticles

The biosynthesis of CuNPs was performed according to Usha *et al.* [20] with slight modifications. The *S. chinensis* aqueous extract (50 mL) was mixed with 200 mL of 1 mM aqueous copper sulphate pentahydrate solution under continuous stirring at 80 °C on a hot plate. The plant extract was mixed by slow drip with the copper solution for 4 h. After complete mixing of the plant extract and precursor the mixture was incubated at 31 °C for 24 h. A color change from yellow to brick brown was observed that indicated the formation of copper nanoparticles. The solution was then centrifuged at 6000 rpm for 30 min. followed by re-dispersion of the pellets in deionized water to remove any unwanted biological materials. This procedure was done three times. Finally, the pellets were filtrated and dried at 80 °C in an oven and stored in screw-capped vials under ambient conditions for further characterization and application.

Characterization of biosynthesized CuNPs

Synthesized copper nanoparticles were subjected to various characterization studies for identification of size and morphology as follows:

UV-Spectroscopy:

The reduction of copper sulphate to copper was monitored by recording UV-Vis spectrum of the reaction mixture after diluting a small aliquot of the sample with deionized water. The measurements were recorded on a Genesys -Thermo Scientific UV-Vis spectrometer (model 10S) operated in 200–800 nm wavelength.

FT-IR analysis of bio-mass before and after bio-reduction:

Fourier-transform infrared spectra of *S. chinensis* berries extract powder and the dried CuNPs were acquired in the range 4000 to 500 cm⁻¹ with a Bruker - Alpha Platinum Infrared Spectrophotometer by ATR technique.

X-Ray diffraction (XRD) studies:

X-ray diffraction measurement of the *S. chinensis* reduced CuNPs was carried out using a powder X-ray diffractometer instrument (PANalytical Xpert Pro) in the angle range of 100-700 operated at a voltage of 40 kV and a current of 30 mA with CuK α radiation in a θ -2 θ configuration. The crystallite domain size was calculated by using Debye- Scherrer formula.

Scanning electron microscopy (SEM):

SEM micrographs of the *S. chinensis* reduced CuNPs were obtained using a SEM Tesca Vega 3 SB microscope.

Antiproliferative activity and apoptosis evaluation

The cytotoxic potential of CuNPs was evaluated *in vitro* on different cell lines such as described below:

Propagation and maintenance of cell lines

The cell lines used in these studies were A549 human lung cancer cell line (CRM-CCL-185TM), HT29 human colorectal adenocarcinoma cell line (ATCC[®] HTB-38TM) and MCF7 breast cancer cell line (ATCC[®] HTB-22TM). All lines were maintained in DMEM with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 UI/mL), streptomycin (100 µg/mL), and 10% of Fetal bovine serum (FBS). Cells were cultured in T-25 flasks at 37.0 °C, 5% CO₂ and 80% relative humidity, changing media at least twice a week.

Sample preparation

S. chinensis reduced CuNPs stock solution (50 mg/mL) was made in a DMSO-phosphate-buffered solution (PBS) (1:1) mix and five 1:2 serial dilutions starting with 100 µg/mL were prepared in culture media and added to the cells. *S. chinensis* aqueous extract, while CuSO₄·5H₂O solutions were used as controls. In all experiments, the final concentration of DMSO in the wells was below to 0.1%.

In-vitro cytotoxic essay

The cells were seeded in 96-well flat-bottom plates at a density of 20000 cells per well for HT-29 and 5000 for A549 and MCF-7. Once the cells adhered to the support, they were exposed to treatments for 72 h. The effect of the vehicle was evaluated in all tests. The cytotoxicity of CuNPs, CuSO₄·5H₂O and *S. chinensis* extract was evaluated by the resazurin reduction assay.

Resazurin reduction essay

Following the exposure times to the treatments, the medium was replaced by 100 µL of 44 µM resazurin; then, after 4 hours of incubation, the fluorescence emitted by the viable and/or metabolically active cells was quantified at an excitation wavelength of 535 nm and an emission of 595 nm using a TECAN GENios spectrofluorometer. Assays were performed over three independent weeks in triplicate. The results were reported in terms of percentages of viability with respect to the control without treatment.

Apoptosis assay

The induction of apoptosis was examined using the fluorescein isothiocyanate (FITC) Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (BioLegend Inc., San Diego, USA) following the manufacturer's instructions. After treatment, attached cells were collected by trypsinization and washed with PBS, cell pellet obtained was resuspended in 50 μ L of 1x annexin V binding buffer and incubated for 15 min at room temperature in the presence of 2 μ L of annexin V-FITC and 2 μ L of 7-AAD. After incubation, 200 μ L of 1x annexin V binding buffer was added, and the percentage of apoptotic cells was analyzed using a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) and the FlowJo software (TreeStar, Inc). For each sample, 10000 total events were acquired. All experiments were conducted in triplicated, and cells treated with 100 nM of paclitaxel were included as death control.

Statistical analysis

All data were analyzed using Prism Software version 9.5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was determined using the *T*-test to compare two independent groups. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

UV-Vis Analysis spectra

The UV-Vis spectrum conducted on the aqueous dispersion of copper nanoparticles synthesized from the extract of *S. chinensis* showed a peak of maximum absorption at 475 nm as illustrated in Fig. 1. The solution exhibited a greenish-brown coloration after the reaction, which is consistent with previous reports confirming the production of nanoparticulate material [50]. The maximum absorption peak corresponds to the Surface Plasmon Resonance (SPR). Its position in this spectrum scale depends on various factors, such as the particle shape, size, the solvent used, and the general synthesis conditions, including factors like agitation and temperature, among others. However, absorption in this region of the UV spectrum confirms the formation of the metallic nanoparticles [51].

Infra Red Analysis spectra

During the bioreduction process, organic molecules lead to the formation of metallic nanoparticles. Consequently, the organic functional groups of the stabilizing molecules can be observed through infrared spectra. The infrared spectrum reveals various organic functional groups. In our case, the obtained nanoparticles were analyzed using

the FTIR (Fourier Transform Infrared) technique, and the results were compared with the spectrum of the dried sample of the pure aqueous extract of *S. chinensis*. The FTIR spectrum ($\nu_{\max}$ (cm^{-1})) of aqueous *S. chinensis* extract showed many characteristics absorption bands, namely at 3308 cm^{-1} (ν_{OH} , s, broad, polyhydroxyl hydrogen bonding), 2928 cm^{-1} (ν_{CH} , H_3CO , m), 1710 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$, C=O , s), 1528 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-C aromatic}}$, C-C aromatic , m), 1406 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-N}}$, amide, s), 1246 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$, phenolic, s), 1029 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$, ether, s) and 936 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H}}$, alkene, s); whereas, the synthesized nanoparticles at 3302 cm^{-1} (ν_{OH} , s, broad, polyhydroxyl hydrogen bonding), 2914 cm^{-1} (ν_{CH} , H_3CO , m), 1582 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-C aromatic}}$, C-C aromatic , m), 1371 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-N}}$, amide, m), 1025 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$, ether, s) and 613 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H aromatic}}$, C-H aromatic , s), as can be seen in figures 2 and 3.

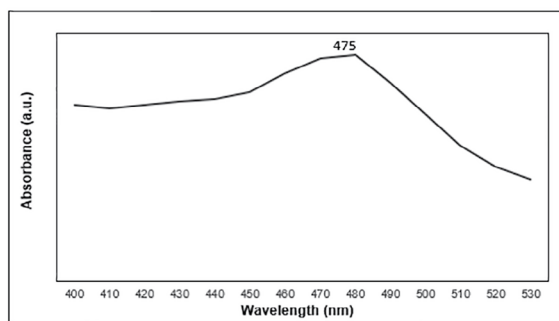


Figure 1. The UV spectrum of the nanoparticle dispersion.

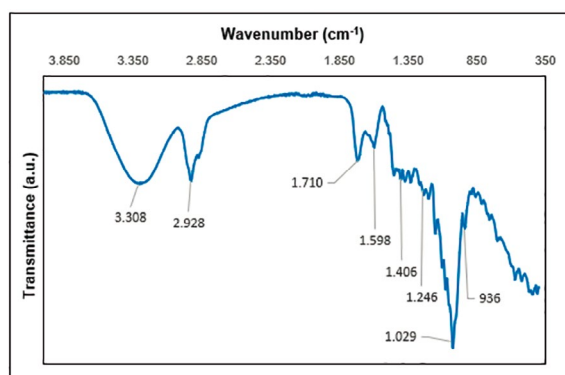


Figure 2. FTIR spectrum of *S. chinensis* aqueous extract

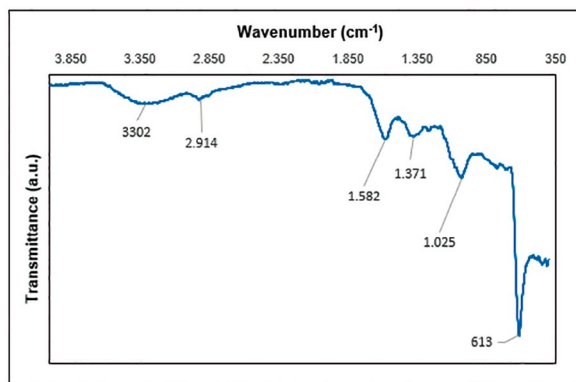


Figure 3. FTIR spectrum of copper nanoparticles

The infrared spectra of both the aqueous extract of *S. chinensis* and the formed nanoparticles display the characteristic functional organic groups found in the most abundant secondary metabolites of plant species, such as lignans [52]. The spectra confirm the presence of organic reducing groups that could exert dual function: on the one hand, the bioreduction of the metallic substrate, and, on the other hand, the stabilization of the formed nanoparticles.

X-Ray diffraction spectrum analysis

The crystallinity and crystallite size of copper nanoparticles synthesized were confirmed by XRD analysis as shown in Fig. 4 (red line).

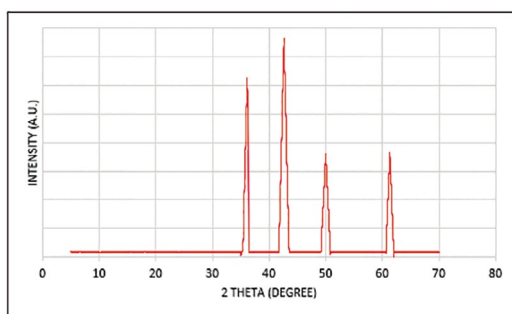


Figure 4. XRD pattern of copper nanoparticles

XRD spectrum showed distinct diffraction peaks at $2\theta = 36.12^\circ$, 42.6° , 50° and 61.3° . The crystallite size and crystallinity of copper nanoparticles synthesized from the aqueous extract of *S. Chinensis* were calculated according to the modified Scherrer equation

[53-55]. The crystallite size and crystallinity were found around 263.6 Å under the described experimental conditions, which indicates a high surface area and also a surface area/volume ratio of these nanoparticles.

Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning Electron Microscopy allowed the observation of the surface morphology of nanoparticles. The SEM study demonstrated that size was around 26 nm, as could be inferred from the X-ray diffraction studies. In Fig. 5, spherical nanoparticles can be observed, along with some agglomerations, which possibly result from electrostatic interactions or hydrogen bonding between the different functional groups of the organic molecules that make up the coating of the generated nanoparticles.



Figure 5. SEM image showing copper nanoparticles

Antiproliferative activity and apoptosis evaluation

The *in vitro* antiproliferative activity of reduced CuNPs, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and *S. chinensis* extract was evaluated in lung cancer cells (A549), colon cancer cells (HT-29) and breast cancer cells (MCF-7) using the resazurin reduction assay, which is based on the ability of viable and metabolically active cells to reduce resazurin to resorufin. The results are shown in Fig. 6 and suggest that *S. chinensis* reduced CuNPs induce cytotoxic effects on all cancer cells in a dose-dependent manner, with 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ being the most effective concentrations at 72 h post-treatment. Interestingly, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and extract does not affect the cell viability of tumor cell; in this way, only a moder-

ate reduction of cell viability was observed in HT-29 cells at the highest concentration tested. When the cell viability was compared, highly significant differences ($p \leq 0.0001$) between the three treatments in all tumor cell lines at the highest concentrations tested, were observed. On the other hand, calculated IC₅₀ values showed that HT-29 (IC₅₀ = 42.64 $\mu\text{g/mL}$) and MCF-7 cells (IC₅₀ = 40.68) were the most sensitive in comparison with A549 cells (IC₅₀ = 63.78) to treatment with CuNPs.

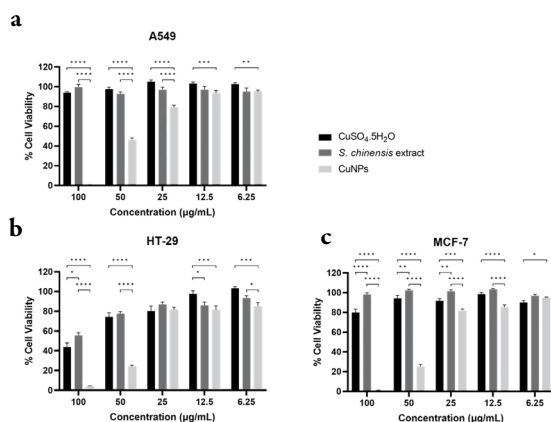


Figure 6. *S. chinensis* reduced CuNPs decreases cell viability of cancer cells in a dose-dependent manner. Three cancer cell lines (a) A549 (b) HT-29 and (c) MCF-7 were treated with different concentrations of CuNPs by 72 h. CuSO₄·5H₂O and *S. chinensis* extract were used as controls. Cells were incubated for 4 h after treatments with resazurin 44 μM , the fluorescence of each well was recorded using a spectrofluorometer ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$) and percent viability was calculated using the fluorescence of untreated wells as 100%. The results are shown as the means $\pm$ standard error of the mean (SEM) from three independent experiments conducted in triplicate. (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$, (****) $p \leq 0.0001$.

The resazurin assay measures changes in the redox metabolism that indicate a decrease in the cellular proliferation/viability, although they do not distinguish between the types of cellular death. For this reason, the presence of apoptotic cells through an annexin-V binding assay by flow cytometry was analyzed. As shown in Fig. 7, more than 80% of CuNPs-treated cells at the highest concentrations (100 or 50 $\mu\text{g/mL}$) were annexin-V positive, except for A549, on which a high level of apoptosis was induced at 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 7a). Similarly, a high proportion of death cell was only detected in HT-29 and MCF-7 cells treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ of CuSO₄·5H₂O (81.7% and 92.3%, respectively; Figs. 7b and 7c); however, significant differences in apoptosis induction

between treatments were found at different concentrations. The percentage of A549 cells binding annexin-V was significantly higher in cultures treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ of CuNPs in comparison with those treated with $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ at the same concentration (90.5% versus 39.5%, respectively; $p \leq 0.01$; Fig. 7a). Interestingly, this difference was also observed in HT-29 and MCF-7 cells at a lower concentration. As shown in Figs. 7b and 7c, apoptosis induction on these cells was significantly enhanced after treatment with CuNPs 50 $\mu\text{g/mL}$ compared to $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ at the same concentration (82.1% and 93.7% versus 22.2% and 10.2%, respectively; $p \leq 0.0001$). In contrast, the *S. chinensis* aqueous extract did not induce significant apoptotic cell death in any of the tested cells.

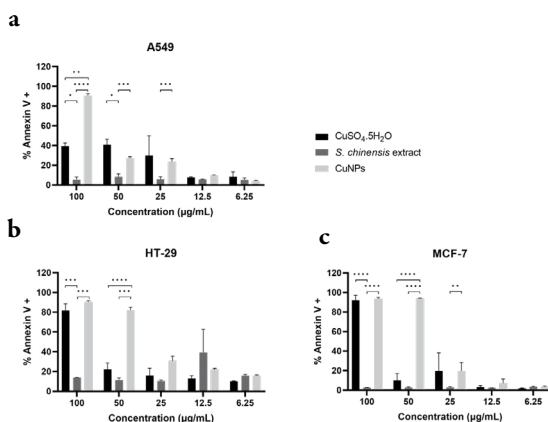


Figure 7. Apoptosis induction by *S. chinensis* reduced CuNPs in cancer cell lines. Three cancer cell lines (a) A549 (b) HT-29 and (c) MCF-7 were treated with different concentrations of CuNPs by 72 h and the apoptotic cells were identified analyzing the annexin-V binding to cell surface by flow cytometry. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and *S. chinensis* extract were used as controls. The results are shown as the means $\pm$ SEM from three independent experiments conducted in triplicate. (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$, (****) $p \leq 0.0001$.

To determine the percentage of early and late apoptotic cells in CuNPs-exposed cultures, flow cytometry was performed now using annexin-V and 7AAD. Early apoptotic cells showed annexin V+/7AAD– staining patterns, whereas late apoptotic cells exhibited annexin V+/7AAD+ staining patterns due to a loss of cell membrane integrity. In non-treated control cells, 3.79% of the A549 cells, 7.77% of the HT-29 cells and 2.90% of the MCF-7 cells were in early apoptosis, whereas 1.44%, 3.08% and 1.44% of the A549, HT-29 and MCF-7 cells, respectively, were in late apoptosis (Fig. 8). Simi-

lar results were obtained using *S. chinensis* extract, but exposition to $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ resulted in a slightly higher early and late apoptosis processes. In contrast, after exposure to CuNPs, a significant increase of both apoptotic stages was identified within all cell cultures. Thus, 16.0% of the A549 cells, 17.9% of the HT-29 cells and 13.1% of the MCF-7 cells were in early apoptosis, whereas 76.6%, 61.1% and 81.2% of the A549, HT-29 and MCF-7 cells, respectively, were in late apoptosis. In contrast, a very low percentage of cells were in necrosis (annexin V-/7AAD+). All these results suggest that the *S. chinensis* reduced CuNPs were able to induce mainly early apoptotic cell death in cancer cells in a concentration-dependent manner.

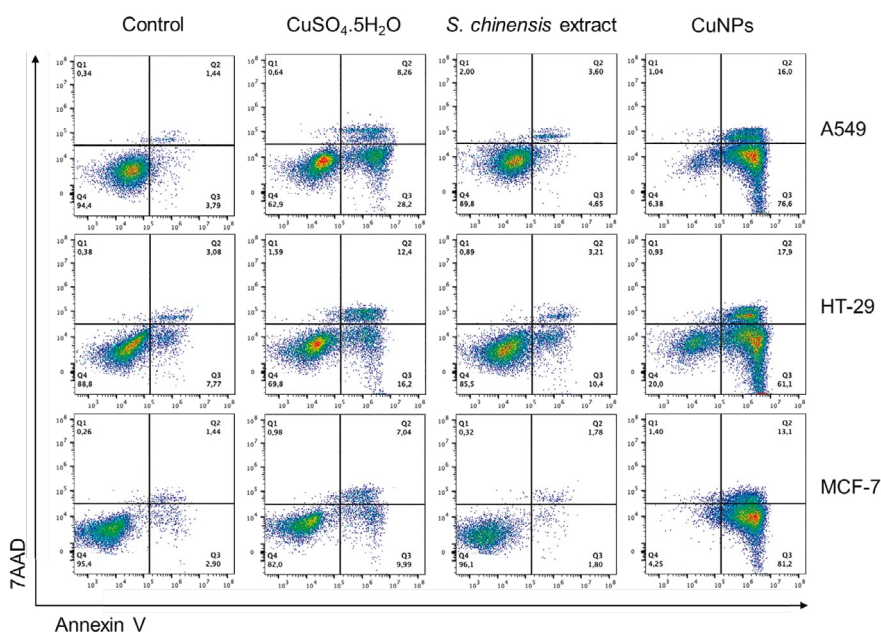


Figure 8. Early apoptosis was detected in A549, HT-29 and MCF-7 cells treated with *S. chinensis* reduced CuNPs. After a 72 h treatment with 100 $\mu\text{g/mL}$ (A549) or 50 $\mu\text{g/mL}$ (HT-29 and MCF-7) of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *S. chinensis* extract or CuNPs, cells were stained with FITC annexin-V and 7-AAD. The percentage of annexin-V and/or 7-AAD positive cells was analyzed by flow cytometry. Dot plots from one representative of three independent experiments are shown. The control column represents cells without treatment.

CONCLUSIONS

Copper nanoparticles (CuNPs) were synthesized using a green synthesis method from the aqueous extract of *Schisandra chinensis* fruits. The obtained nanoparticles were characterized through spectroscopic methods, revealing a uniform particle size of approximately 26 nm. These nanoparticles were tested against three different tumor cell lines. Results suggest that the *S. chinensis* reduced CuNPs were able to induce mainly early apoptotic cell death in cancer cells in a concentration-dependent manner.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our gratitude to the Facultad de Ciencias – Universidad El Bosque (Bogotá D.C., Colombia), specifically the Department of Pharmaceutical Chemistry, and the Facultad de Ciencias – Universidad Nacional de Colombia (Bogotá D.C., Colombia), particularly the Department of Physics, for their technical support in providing reagents and materials, as well as for making their facilities and equipment available for the development of this research.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. S. Panigrahi, S. Kundu, S.K. Ghosh, S. Nath, T. Pal, General method of synthesis for metal nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*, **6**(4), 411-414 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1007/S11051-004-6575-2>
2. A. Tamilvanan, K. Balamurugan, K. Ponappa, B.M. Kumar, Copper nanoparticles: Synthetic strategies, properties and multifunctional application, *International Journal of Nanoscience*, **13**(2), 1430001 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1142/S0219581X14300016>
3. M.I. Din, R. Rehan, Synthesis, characterization, and applications of copper nanoparticles, *Analytical Letters*, **50**(1), 50-62 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1172081>

4. M. Raffi, S. Mehrwan, T.M. Bhatti, J.I. Akhter, A. Hameed, W. Yawar, M.M.u. Hasan, Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*, *Annals of Microbiology*, **60**(1), 75-80 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0015-6>
5. E. Sizova, S. Miroshnikov, V. Polyakova, N. Gluschenko, A. Skalny, Copper nanoparticles as modulators of apoptosis and structural changes in tissues, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, **3**, 97-104 (2012). Doi: <https://doi.org/10.4236/jbnnb.2012.31013>
6. P. Fakhri, B. Jaleh, M. Nasrollahzadeh, Synthesis and characterization of copper nanoparticles supported on reduced graphene oxide as a highly active and recyclable catalyst for the synthesis of formamides and primary amines, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **383-384**, 17-22 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2013.10.027>
7. N. Nagar, V. Devra, Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using *Azadirachta indica* leaves, *Materials Chemistry and Physics*, **213**, 44-51 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.04.007>
8. S.S. Joshi, S.F. Patil, V. Iyer, S. Mahumuni, Radiation induced synthesis and characterization of copper nanoparticles, *Nanostructured Materials*, **10**(7), 1135-1144 (1998). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0965-9773\(98\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0965-9773(98)00153-6)
9. S. Chandra, A. Kumar, P.K. Tomar, Synthesis and characterization of copper nanoparticles by reducing agent, *Journal of Saudi Chemical Society*, **18**(2), 149-153 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.06.009>
10. P.K. Khanna, S. Gaikwad, P.V. Adhyapak, N. Singh, R. Marimuthu, Synthesis and characterization of copper nanoparticles, *Materials Letters*, **61**(25), 4711-4714 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.03.014>
11. L. Zhou, S. Wang, H. Ma, S. Ma, D. Xu, Y. Guo, Size-controlled synthesis of copper nanoparticles in supercritical water, *Chemical Engineering Research and Design*, **98**, 36-43 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.04.004>
12. N.A. Dhas, C.P. Raj, A. Gedanken, Synthesis, characterization and properties of metallic copper nanoparticles, *Chemistry of Materials*, **10**(5), 1446-1452 (1998). Doi: <https://doi.org/10.1021/cm9708269>

13. B. Khodashenas, H.R. Ghorbani, Synthesis of copper nanoparticles: An overview of the various methods, *Korean Journal of Chemical Engineering*, **31**(7), 1105-1109 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1007/S11814-014-0127-Y>
14. I. Hussain, N.B. Singh, A. Singh, H. Singh, S.C. Singh, Green synthesis of nanoparticles and its potential application, *Biotechnology Letters*, **38**(4), 545-560 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1007/S10529-015-2026-7>
15. A. Gour, N.K. Jain, Advances in green synthesis of nanoparticles, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **47**(1), 844-851 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577878>
16. K. Parveen, V. Banse, L. Ledwani, Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages, *AIP Conference Procedures*, **1724**(1), 020048 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1063/1.4945168>
17. M.I. Din, F. Arshad, Z. Hussain, M. Mukhtar, Green adeptness in the synthesis and stabilization of copper nanoparticles: Catalytic, antibacterial, cytotoxicity, and antioxidant activities, *Nanoscale Research Letters*, **12**(1), 638 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2399-8>
18. A.H. Keihan, H. Veisi, H. Veasi, Green synthesis and characterization of spherical copper nanoparticles as organometallic antibacterial agent, *Applied Organometallic Chemistry*, **31**(7), e3642 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1002/aoc.3642>
19. A.T. Joseph, P. Prakash, S.S. Narvi, Phytofabrication and characterization of copper nanoparticles using *Allium sativum* and its antibacterial activity, *International Journal of Science, Engineering and Technology*, **4**(2), 463-472 (2016). URL: <https://www.ijset.in/wp-content/uploads/2016/05/10.2348.ijset03160463.pdf>
20. S. Usha, K.T. Ramappa, S. Hiregoudar, G.D. Vasanthkumar, D.S. Aswathana-rayana, Biosynthesis and characterization of copper nanoparticles from tulasi (*Ocimum sanctum* L.) leaves, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **6**(11), 2219-2228 (2017). Doi: <https://doi.org/10.20546/ijc-mas.2017.611.263>
21. K. Ebrahimi, S. Shiravand, H. Mahmoudvand, Biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Capparis spinosa* fruit and investigation of its antibacterial activity, *Marmara Pharmaceutical Journal*, **21**(4), 866-871 (2017). URL: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/407366>

22. M.W. Amer, A.M. Awwad, Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus limon* fruits extract, characterization and antibacterial activity, *Chemistry International*, **7**(1), 1-8 (2020). Doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4017993>
23. N. Jayarambabu, A. Akshaykranth, T. Venkatappa-Rao, K. Venkateswara-Rao, R. Rakesh-Kumar, Green synthesis of Cu nanoparticles using *Curcuma longa* extract and their application in antimicrobial activity, *Materials Letters*, **259**, 126813 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126813>
24. H.J. Lee, J.Y. Song, B.S. Kim, Biological synthesis of copper nanoparticles using *Magnolia kobus* leaf extract and their antibacterial activity, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **88**(11), 1971-1977 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1002/JCTB.4052>
25. S. Kirubandanan, V. Subha, S. Renganathan, Green synthesis of copper nanoparticles using methanol extract of *Passiflora foetida* and its drug delivery applications, *International Journal of Green Chemistry*, **3**(2), 31-52 (2017). URL: <https://chemical.journalspub.info/index.php?journal=IJGC&page=article&cop=view&path%5B%5D=399>
26. S. Amaliyah, D.P. Pangesti, M. Masruri, A. Sabarudin, S.B. Sumitro, Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using *Piper retrofractum* Vahl extract as bioreductor and capping agent, *Heliyon*, **6**(8), e04636 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04636>
27. P.N. Padma, S.T. Banu, S.C. Kumari, Studies on green synthesis of copper nanoparticles using *Punica granatum*, *Annual Research & Review in Biology*, **23**(1), 1-10 (2018). Doi: <https://doi.org/10.9734/arrb/2018/38894>
28. S. Thakur, S. Sharma, S. Thakur, R. Radheshyam, Green synthesis of copper nano-particles using *Asparagus adscendens* roxb. Root and leaf extract and their antimicrobial activities, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **7**(4), 683-694 (2018). Doi: <https://doi.org/10.20546/ijc-mas.2018.704.077>
29. R.M. Kiriyanthan, S.A. Sharmili, R. Balaji, S. Jayashree, S. Mahboob, K.A. Al-Ghanim, F. Al-Misned, Z. Ahmed, M. Govindarajan, B. Vaseeharan, Photocatalytic, antiproliferative and antimicrobial properties of copper nanoparticles synthesized using *Manilkara zapota* leaf extract: A photodynamic approach, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **32**, 102058 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102058>

30. P. Kachesova, I. Goroshinskaya, V. Borodulin, The effect of copper nanoparticles on the progression of tumor *in vivo*, *Journal of Clinical Oncology*, **31**(15), 3084-3084 (2013). Doi: https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.15_suppl.3084
31. D. Bharathi, R. Ranjithkumar, B. Chandarshekar, V. Bhuvaneshwari, Bio-inspired synthesis of chitosan/copper oxide nanocomposite using rutin and their anti-proliferative activity in human lung cancer cells, *International Journal of Biological Macromolecules*, **141**, 476-483 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.235>
32. E. Halevas, A. Pantazaki, Copper nanoparticles as therapeutic anticancer agents, *Nanomedicine and Nanotechnology Journal*, **2**(1), 119 (2018). URL: <https://www.scientificliterature.org/Nanomedicine/Nanomedicine-18-119.pdf>
33. K.M. Metz, S.E. Sanders, J.P. Pender, M.R. Dix, D.T. Hinds, S.J. Quinn, A.D. Ward, P. Duffy, R.J. Cullen, P.E. Colavita, Green synthesis of metal nanoparticles via natural extracts: The biogenic nanoparticle corona and its effects on reactivity, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **3**(7), 1610-1617 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00304>
34. H. Du, X. Tan, Z. Li, H. Dong, L. Su, Z. He, Q. Ma, S. Dong, M. Ramachandran, J. Liu, L. Cao, Effects of *Schisandra chinensis* polysaccharide-conjugated selenium nanoparticles on intestinal injury in mice, *Animals*, **13**(5), 930 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3390/ani13050930>
35. A. Szopa, R. Ekiert, H. Ekiert, Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies, *Phytochemistry Reviews*, **16**(2), 195-218 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1007/S11101-016-9470-4>
36. T. Zhao, G. Mao, M. Zhang, Y. Zou, W. Feng, X. Gu, Y. Zhu, R. Mao, L. Yang, X. Wu, Enhanced antitumor and reduced toxicity effect of *Schisanrae* polysaccharide in 5-Fu treated Hep5-bearing mice, *International Journal of Biological Macromolecules*, **63**, 114-118 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.037>
37. W. Li, X.N. Qu, Y. Han, S.W. Zheng, J. Wang, Y.P. Wang, Ameliorative effects of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) from *Schisandra chinensis* on alcoholic liver oxidative injury in mice, *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(2), 2446 (2015). Doi: <https://doi.org/10.3390/IJMS16022446>

38. O. Wang, Q. Cheng, J. Liu, Y. Wang, L. Zhao, F. Zhou, B. Ji, Hepatoprotective effect of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. lignans and its formula with *Rubus idaeus* on chronic alcohol-induced liver injury in mice, *Food & Function*, **5**(11), 3018-3025 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1039/C4FO00550C>
39. L. Zhang, H. Chen, J. Tian, S. Chen, Antioxidant and anti-proliferative activities of five compounds from *Schisandra chinensis* fruit, *Industrial Crops and Products*, **50**, 690-693 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.044>
40. E.J. Jeong, H.K. Lee, K.Y. Lee, B.J. Jeon, D.H. Kim, J.-H. Park, J.-H. Song, J. Huh, J.-H. Lee, S.H. Sung, The effects of lignan-riched extract of *Schisandra chinensis* on amyloid- β -induced cognitive impairment and neurotoxicity in the cortex and hippocampus of mouse, *Journal of Ethnopharmacology*, **146**(1), 347-354 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2013.01.003>
41. H. Liu, C. Wu, S. Wang, S. Gao, J. Liu, Z. Dong, B. Zhang, M. Liu, X. Sun, P. Guo, Extracts and lignans of *Schisandra chinensis* fruit alter lipid and glucose metabolism *in vivo* and *in vitro*, *Journal of Functional Foods*, **19**(Part A), 296-307 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.09.049>
42. M.K. Kim, J.M. Lee, J.S. Do, W.S. Bang, Antioxidant activities and quality characteristics of omija (*Schizandra chinensis* Baillon) cookies, *Food Science and Biotechnology*, **24**(3), 931-937 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1007/S10068-015-0120-1>
43. K. Fu, H. Zhou, C. Wang, L. Gong, C. Ma, Y. Zhang, Y. Li, A review: Pharmacology and pharmacokinetics of Schisandrin A, *Phytotherapy Research*, **36**(6), 2375-2393 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1002/PTR.7456>
44. F. Sa, B.J. Guo, S. Li, Z.J. Zhang, H.M. Chan, Y. Zheng, S.M.Y. Lee, Pharmacokinetic study and optimal formulation of new anti-parkinson natural compound schisantherin A, *Parkinson's Disease*, **2015**, 951361 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1155/2015/951361>
45. X. Wang, X. Wang, H. Yao, C. Shen, K. Geng, H. Xie, A comprehensive review on Schisandrin and its pharmacological features, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **397**, 783-794 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1007/S00210-023-02687-Z>

46. J. Pei, Q. Lv, J. Han, X. Li, S. Jin, Y. Huang, S. Jin, H. Yuan, Schisandra lignans-loaded enteric nanoparticles: preparation, characterization, and *in vitro*–*in vivo* evaluation, *Journal of Drug Targeting*, **21**(2), 180-187 (2013). Doi: <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.737000>
47. M. Shno, W. Yang, G. Han, Protective effects on myocardial infarction model: delivery of schisandrin B using matrix metalloproteinase-sensitive peptide-modified, PEGylated lipid nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 7121-7130 (2017). doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S141549>
48. S.G. Balwe, A.A. Rokade, S.S. Park, Y.T. Jeong, Green synthesis and characterization of supported gold nanoparticles (Au@PS) from *Schisandra chinensis* fruit extract: An efficient and reusable catalyst for the synthesis of chromeno[2,3-d]pyrimidin-2-yl)phenol derivatives under solvent-free conditions, *Catalysis Communications*, **128**, 105703 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2019.05.010>
49. A. Chen, R. Hu, Self-assembly loading of *Schisandra chinensis* nanoparticles and its effect on the malignant biological behavior of ovarian cancer cells, *Science of Advanced Materials*, **15**(2), 243-255 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1166/SAM.2023.4447>
50. I. Subhankari, P.L. Nayak, Synthesis of copper nanoparticles using *Syzygium aromaticum* (cloves) aqueous extract by using green chemistry, *World Journal of Nano Science & Technology*, **2**(1), 14-17 (2013). URL: [https://www.idosi.org/wjnst/2\(1\)13/4.pdf](https://www.idosi.org/wjnst/2(1)13/4.pdf)
51. M. Atarod, M. Nasrollahzadeh, S.M. Sajadi, Green synthesis of a Cu/reduced graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite using *Euphorbia wallichii* leaf extract and its application as a recyclable and heterogeneous catalyst for the reduction of 4-nitrophenol and rhodamine B, *RSC Advances*, **5**(111), 91532-91543 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1039/C5RA17269A>
52. C.-C. Chyau, Y.-B. Ker, C.-H. Chang, S.-H. Huang, H.-E. Wang, C.-C. Peng, R.Y. Peng, *Schisandra chinensis* peptidoglycan-assisted transmembrane transport of lignans uniquely altered the pharmacokinetic and pharmacodynamic mechanisms in human HepG2 cell model, *PLoS One*, **9**(1), e85165 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085165>

53. M.S. Hossain, S. Ahmed, Sustainable synthesis of nano CuO from electronic waste (E-waste) cable: Evaluation of crystallite size via Scherrer equation, Williamson-Hall plot, Halder-Wagner model, Monshi-Scherrer model, size-strain plot, *Results in Engineering*, **20**, 101630 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101630>
54. F.T.L. Muniz, M.A.R. Miranda, C. Morilla Dos Santos, J.M. Sasaki, The Scherrer equation and the dynamical theory of X-ray diffraction, *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*, **72**(3), 385-390 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1107/s205327331600365x>
55. A. Monshi, M.R. Foroughi, M.R. Monshi, Modified Scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD, *World Journal of Nano Science and Engineering*, **02**(03), 154-160 (2012). Doi: <https://doi.org/10.4236/wjnse.2012.23020>

HOW TO CITE THIS ARTICLE

D.A. Tinjacá, O.A. Almanza, F. Delgado, S.J. Morantes, M.C. Medina, P. Torres, E. Martinez, Preparation and characterization of copper nanoparticles of *Schisandra chinensis* and evaluation of its antiproliferative activity, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 244-265 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.112982>

Aptitud y conocimiento sobre Medicamentos de Venta Libre en Colombia: un análisis de la automedicación responsable

Marcia Andrea Yucuma-Guzmán¹, Julián David Castañeda-Muñoz², Fredy Angarita-Reina³, Claudia Lorena García Rojas⁴, Henry Rubiano Daza^{5*}

¹ Grupo de Investigación de Ingenierías UCC-Neiva, Facultad de Ingeniería, Sede Neiva, Universidad Cooperativa de Colombia, Neiva 410001, Colombia

² Subdirección de investigación, trabajo social, Grupo de Investigación en Procesos Sociales, Subjetividad y cognición, Corporación Universitaria Minuto de Dios-UNIMINUTO, Neiva 410001, Colombia.

³ Universidad Cooperativa de Colombia, Sede Bucaramanga, Facultad de Ingeniería, Ingeniería de Sistemas, Grupo de Investigación en Tecnologías de la Información GITI, Carrera 33 No 33 a-05, Bucaramanga, Santander, Colombia

⁴ Programa de Odontología, Universidad Antonio Nariño, Sede Neiva, Calle 19 # 42-98, Neiva, Colombia

⁵ Grupo de Investigación en Dinámicas Sociales, Universidad Cooperativa de Colombia, Sede Neiva, Neiva 410001, Colombia. *Correo electrónico: Henry.Rubiano@campusucc.edu.co

Recibido: 4 de octubre de 2023

Revisado: 2 de febrero de 2024

Aceptado: 12 de febrero de 2024

RESUMEN

Introducción: La automedicación es una práctica ávida de la población colombiana que presenta prevalencias hasta del 86,8%. Si bien la Organización Mundial de la Salud apuesta por el uso racional del medicamento y en este contexto a la autogestión responsable de la salud del individuo (automedicación responsable), la poca o nula capacitación sobre el consumo de medicamentos de venta libre de manera responsable, sumado a la publicidad poco realista de las farmacéuticas, conduce a prácticas peligrosas de automedicación. **Objetivo:** Por ende, el objetivo de esta investigación es evaluar la aptitud y el conocimiento de la población colombiana frente al consumo de medicamentos de venta libre. **Metodología:** Para el desarrollo del estudio se aplicó una encuesta de prevalencia en línea, utilizando las redes sociales de Facebook, X y WhatsApp, mediante el método de bola nieve. De igual forma, se utilizó un análisis descriptivo para determinar la frecuencia y el porcentaje,

y se hizo uso de la prueba de Chi-Cuadrado para identificar cualquier asociación.

Resultados: De acuerdo con los resultados, el 36% de la población presenta una buena aptitud sobre el uso medicamentos de venta libre y al evaluar el conocimiento respecto a los medicamentos de venta libre un 47% de la población colombiana tiene buen conocimiento. **Conclusión:** El estudio evidencia que la población colombiana tiende a presentar hábitos relacionados con una práctica de automedicación no responsable.

Palabras clave: Medicamentos de venta libre, automedicación responsable, aptitud, Farmacovigilancia, salud pública.

SUMMARY

Aptitude and knowledge about OTC medicines in Colombia: an analysis of responsible self-medication

Introduction: Self-medication is an avid practice of the Colombian population with prevalence rates of up to 86.8%. Although the World Health Organization is committed to the rational use of medicines and in this context to responsible self-management of the individual's health, little or no training on the responsible consumption of over-the-counter medicines, added to advertising unrealistic of pharmaceutical companies, leads to dangerous self-medication practices. **Purpose:** The objective of this research is to evaluate the attitude and knowledge of the Colombian population towards the consumption of over-the-counter medications. **Methodology:** To develop the study, an online prevalence survey was applied, using the social networks Facebook, X and WhatsApp, using the snowball method. Likewise, a descriptive analysis was used to determine the frequency and percentage, and the chi square test was used to identify any association. **Results:** According to the results, 36% of the population has a good attitude towards the use of over-the-counter medications; moreover, when evaluating knowledge regarding over-the-counter medications, 47% of the Colombian population has good knowledge. **Conclusion:** The study shows that the Colombian population tends to present habits related to a non-responsible self-medication practice.

Keywords: Over-the-counter medications, responsible self-medication, attitude, Pharmacovigilance, public health.

RESUMO

Aptidão e conhecimento sobre medicamentos isentos de prescrição na Colômbia: uma análise da automedicação responsável

Introdução: A automedicação é uma prática ávida da população colombiana que apresenta prevalências de até 86,8%. Embora a Organização Mundial da Saúde esteja comprometida com o uso racional de medicamentos e, neste contexto, com a auto-gestão responsável da saúde do indivíduo (automedicação responsável), pouca ou nenhuma formação sobre o consumo responsável de medicamentos de venda livre, acrescentou à publicidade irrealista das empresas farmacêuticas, conduz a práticas perigosas de automedicação. **Objetivo:** Portanto, o objetivo desta pesquisa é avaliar a aptidão e o conhecimento da população colombiana em relação ao consumo de medicamentos isentos de prescrição. **Metodologia:** Para desenvolver o estudo foi aplicada uma pesquisa de prevalência online, utilizando as redes sociais Facebook, X e WhatsApp, utilizando o método bola de neve. Da mesma forma, foi utilizada análise descritiva para determinar a frequência e percentual, e o teste Qui-Quadrado foi utilizado para identificar qualquer associação. **Resultados:** De acordo com os resultados, 36% da população tem boa aptidão para o uso de medicamentos de venda livre e ao avaliar o conhecimento sobre medicamentos de venda livre, 47% da população colombiana tem bom conhecimento. **Conclusão:** O estudo mostra que a população colombiana tende a apresentar hábitos relacionados à prática de automedicação não responsável.

Palavras-chave: Medicamentos de venda livre, automedicação responsável, condicionamento físico, Farmacovigilância, saúde pública.

INTRODUCCIÓN

La automedicación es definida como el consumo de medicamentos, drogas o remedios caseros, por decisión propia, consejo de un tercero o en el caso de niños y niñas por decisión de sus padres sin prescripción médica [1]. Hay dos vertientes en relación con la práctica de automedicación si el individuo tiene voluntad y capacidad para participar de manera inteligente y autónoma (informados) en las decisiones y en la gestión de las actividades preventivas, diagnósticas y terapéuticas que les corresponden en relación con sus dolencias, se infiere una automedicación responsable [2, 3], de otro lado, la automedicación no responsable puede acarrear problemas como efectos adversos por

dosis inadecuadas o interacciones medicamentosas, por lo cual es considerada una práctica peligrosa y un problema de salud pública [4-6].

Uno de los problemas más apremiantes como consecuencia de la automedicación es el desarrollo de resistencia bacteriana, debido al consumo no responsable de antibióticos [7, 8]. De acuerdo con la legislación colombiana, los antibióticos se deben vender bajo prescripción médica, no obstante, la laxitud de los establecimientos farmacéuticos frente a la venta de antibióticos conduce a la práctica de automedicación no responsable [9].

Los estudios de automedicación en Colombia muestran porcentajes de prevalencia preocupantes, López-Cabra *et al.*, reportan el 79,3% en automedicación en estudiantes de medicina [10], Rubio *et al.*, por su parte revelan un 89,7% de prevalencia en habitantes de Cartagena, Colombia [11], Tobón-Marulanda da a conocer un indicador de prevalencia del 97% en estudiantes universitarios [5], al igual que Tobón-Marulanda [5], Ortiz *et al.* [6], reportan la prevalencia en ambientes universitarios del 86%, Castro-Espinosa *et al.* anuncian un porcentaje de prevalencia hasta del 76% en antibióticos en comunidades de Cali, Colombia [12], otro estudio realizado por Villegas Cardona *et al.* informa un porcentaje de prevalencia del 61,58% en habitantes de la ciudad de Pereira, Colombia [13], estos estudios además de demostrar que la automedicación es una práctica habitual en la población Colombiana, cuyos porcentajes de prevalencia son muy similares a los reportados en otros países [14-17], también manifiestan la importancia de desarrollar estudios que incluyan una población más representativa, además que permitan identificar los posibles factores que involucren automedicación responsable. En este contexto, en Colombia es claro que los estudios de automedicación son sectorizados, centrándose en universidades y ciudades capitales. Uno de los estudios a nivel país fue el desarrollado por Niño-Orrego *et al.* [9], quienes relacionaron los temas de automedicación, profesionales no médicos y COVID-19, demostrando la influencia del personal de los establecimientos farmacéuticos en la conducta de la automedicación. En este contexto, el presente estudio pretende evaluar la aptitud y el conocimiento de la población colombiana respecto a medicamentos de venta libre, debido a que se encuentran directamente relacionados con la automedicación responsable. Además, teniendo presente que la automedicación responsable propende reducir costos para el manejo de la salud, bajo la premisa que el individuo tiene la capacidad de autodiagnosticar correctamente su dolencia y reconocer algunos aspectos esenciales del medicamento como posología, efectos adversos e interacciones medicamentosas, es necesario evaluar la disposición de población colombiana con relación al uso de medicamentos de venta libre y su conocimiento sobre este tipo de productos, esto permitiría evidenciar los posibles riesgos o fortalezas de la práctica de automedicación responsable en la población colombiana.

Algunos de los resultados más relevantes de la investigación muestran que la población colombiana comprende los riesgos que implica automedicarse, además de tener una buena aptitud y un conocimiento sobresaliente en relación con medicamentos de venta libre; sin embargo también se reportan datos preocupantes como la injerencia de los empleados de establecimientos farmacéuticos en la decisión del paciente.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio observacional de corte transversal-analítico, para evaluar la aptitud y el conocimiento de la población respecto a medicamentos de venta libre y establecer una relación con las variables sociodemográficas. Se utilizó un instrumento compuesto por 24 preguntas adaptado a partir del reportado por Nemat *et al.* [18], dividido en tres secciones; una primera sección de 7 ítems incluye preguntas que buscan caracterizar de manera sociodemográfica la población encuestada; la segunda sección con 9 ítems evalúa la aptitud de los encuestados sobre medicamentos de venta libre y la tercera sección de 8 ítems evalúa el conocimiento sobre medicamentos de venta libre. La población de estudio fue grupos de estudiantes universitarios y colegas de cada uno de los departamentos de Colombia; se utilizó un muestreo no probabilístico por bola de nieve. El tamaño de la muestra se calculó según la ecuación 1 [9], asumiendo una heterogeneidad del 50%, un intervalo de confianza del 95% y una precisión del 5%, extrapolado a una población de 41.215.503 [19]. Así, el tamaño mínimo de muestra requerido es de 385 personas:

$$TM = \frac{NZ^2\sigma^2}{(N-1)e^2 + Z^2\sigma^2} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde N es la población (41.215.503), Z es el valor obtenido de la distribución normal para un nivel de confianza del 95% (1,96), σ es la desviación estándar de la población (0,5) y e es el límite aceptable del error de muestreo (0,05).

Los participantes incluidos fueron mayores de 14 años, nacionalidad colombiana, saber leer, tener conocimientos básicos de informática. Los criterios de exclusión fueron personas de menores de 14 años, analfabetas, y sin conocimientos básicos en informática.

Se recolectaron 558 datos mediante un formulario desarrollado en Microsoft Forms y publicado en las redes sociales Facebook y X, además se envió el enlace del formulario a amigos, familiares, agenda de contactos y grupos de WhatsApp. El formulario, fue validado mediante un piloto de 30 encuestas. El análisis de los datos se realizó en SPSS V.25. La variable edad se recategorizó de acuerdo con la clasificación en función de las etapas de desarrollo establecidas por el Ministerio de Salud y Protección Social

[20], en jóvenes (14-26 años), adultos (27-59 años) y adulto mayor (59 y más). Asimismo, según las respuestas de los participantes se obtuvo una puntuación para clasificar la variable de aptitud (buena y mala) mediante la primera sección y el conocimiento (bueno y escaso) en la segunda sección asumiendo en ambos casos puntajes de aciertos mayores al 60% para buena aptitud y buen conocimiento. Se utilizó proporciones para el análisis descriptivo y la razón de prevalencia, intervalo de confianza del 95% y valor de p ($p < 0,05$) para evaluar la relación entre la aptitud y el conocimiento sobre los medicamentos de venta libre y las variables sociodemográficas.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

De los 558 participantes, 60% corresponde a sexo femenino; el 53% son jóvenes (14-26 años); el 45% adultos (27-59 años) y el 2% adultos mayores (59 y más). Dado que un poco más de la mitad de la población es jóvenes, la mayoría de los encuestados son soltero (66%) y el 34% indicó estar casado o convivir en unión libre. En cuanto su oficio, el 19% indica laborar en oficios relacionadas con el área de la salud y el 53% son estudiantes universitarios. En relación con el nivel socioeconómico el 4% indica pertenecer a un nivel socioeconómico alto (estrato 5 y 6), 72% medio (estrato 3 y 4) y el 24% nivel bajo (estratos 1 y 2). Finalmente, el 47% indica estar afiliado al régimen subsidiado, 45% al régimen contributivo, y un 8% de los encuestados indican no estar afiliado a un sistema de salud.

En la Tabla 1, se reportan los resultados sobre la aptitud que tienen los participantes en el estudio respecto a los medicamentos de venta libre. Se evidencia que el 60,6% de los encuestados han utilizado los medicamentos de venta libre y los ven como una alternativa frente a costos relacionados con citas médicas, también son conscientes (67,4%) que se cuenta con mayor disponibilidad en relación con otros medicamentos. Por otro lado, el 58.2% de las personas conoce la ventaja de Medicamentos de Venta Libre (MVL) en el tratamiento de dolencias menores; una de las alertas frente al uso de MVL es la influencia del empleado (52%) del establecimiento farmacéutico en la decisión del comprador. Un factor importante a tener presente es la sensación de seguridad frente al consumo de MVL, por lo que la falta de tiempo puede generar posibles prácticas inseguras. Tres resultados relevantes de los encuestados son: 1) La publicidad no es un factor decisivo a la hora de consumir MVL, lo que puede ser un indicativo de racionalidad, sin embargo, frente a lo reportado en la literatura, en donde se demuestra la gran influencia de la publicidad en la decisión que toman las personas, el resultado puede ser consecuencia, debido a que posiblemente las personas no sean conscientes de la influencia de la publicidad en su conducta, a la hora de adquirir un medicamento, asumiendo que los hacen de forma libre y consciente [3, 21, 22], 2) La población es

consciente que los medicamentos no deben ser compartidos con otras personas, lo cual es una buena práctica de automedicación responsable y 3) Todo medicamento debe ser almacenado de forma segura, indistintamente de que sea de venta libre o no.

Tabla 1. Aptitud de la población colombiana hacia los medicamentos de venta libre.

Ítems (n=558)	Frecuencia (%)	
	Sí	No
Utilizo Medicamentos de Venta Libre (MVL) debido al alto costo de las visitas a los médicos.	338 (60,6)	220 (39,4)
Los medicamentos de Venta Libre (MVL) son más baratos y están disponibles.	376 (67,4)	182 (32,6)
Es apropiado tratar dolencias menores con Medicamentos de Venta Libre (MVL)	325 (58,2)	233 (41,8)
Con la consulta del farmacéutico (regente, empleado de la farmacia-droguería), me siento tranquilo	290 (52,0)	268 (48,0)
Consumo Medicamentos de Venta Libre debido a que son convenientes de usar (fácil).	386 (69,2)	172 (30,8)
Utilizo Medicamentos de Venta Libre para ahorrar tiempo	362 (64,9)	196 (35,1)
La principal causa del uso de Medicamentos de Venta Libre es la publicidad.	177 (31,7)	381 (68,3)
Está bien compartir Medicamentos de Venta Libre con otras personas.	144 (25,8)	414 (74,2)
Los Medicamentos de Venta Libre resisten mejor las condiciones de almacenamiento, como la temperatura, la humedad y la luz solar directa.	212 (38,0)	346 (62,0)

Al evaluar la relación entre los diferentes factores sociodemográficos en la Tabla 2, en general, las respuestas muestran ser muy homogéneas, siendo la edad la única variable sociodemográfica, en donde se presenta una diferencia estadísticamente significativa de tal forma que la etapa del desarrollo, sugiere que los jóvenes tienden a tener aptitudes menos seguras frente al consumo de MVL.

Las otras variables, presentan resultados con diferencias estadísticamente no significativas, el factor educación es donde se presentan las mayores diferencias, sin embargo, indistintamente de la formación académica, los consumidores presentan una aptitud negativa frente a los MVL. Uno de los resultados más interesantes, es que tanto, las personas de menores recursos económicos y aquellos que no cuentan con ningún tipo de seguridad social, también presentan una aptitud negativa hacia los MVL, teniendo presente que este tipo de medicamentos podrían ser una de las mejores opciones a la hora tratar una dolencia menor, este resultado concuerda con la investigación presentada por Ansari [23].

Tabla 2. Comparación entre participantes con buena o mala aptitud sobre Medicamentos de Venta Libre.

Ítems	Aptitud (%)		RP; (IC 95%)*	p
	Buena	Mala		
Sexo				
Femenino	111 (19,8)	225 (40,5)	0,824; (0,660 – 1,028)	0,088
Masculino	89 (15,9)	133 (23,8)		
Edad				
Adulto	106 (18,9)	158 (28,5)	1,256; (1,005 – 1,569)	0,044
Joven	94 (16,8)	200 (35,8)		
Estado civil				
Casado/Unión libre	72 (12,9)	118 (21,2)	1,089; (0,866 – 1,371)	0,467
Soltero	128 (22,9)	240 (43,0)		
Ocupación (personal de salud)				
Si	32 (5,7)	74 (13,3)	0,812; (0,593 – 1,111)	0,177
No	168 (30,2)	284 (50,8)		
Régimen de salud			χ^2	
Contributivo	90 (16,1)	162 (29,1)	1,660	0,4361
Subsidiado	90 (16,1)	171 (30,6)		
Recursos Propios	20 (3,6)	25 (4,5)		
Nivel socioeconómico				
Alto	11 (1,9)	12 (2,1)	2,200	0,333
Medio	138 (24,7)	264 (47,6)		
Bajo	51 (9,1)	82 (14,6)		
Nivel educativo				
Doctorado	2 (0,35)	6 (1,1)	5,101	0,648
Maestría o especialidad médica	21 (3,7)	36 (6,5)		
Especialista	17 (3,0)	38 (6,8)		
Profesional universitario	29 (5,3)	43 (7,7)		
Técnico – tecnólogo	16 (2,8)	22 (3,9)		
Estudiante universitario	103 (18,4)	190 (34,0)		
Secundaria	12 (2,1)	23 (4,3)		

*RP; (IC 95%): Razón de prevalencia; (Intervalo de confianza 95%).

+ χ^2 : Chi².

Al evaluar el conocimiento sobre MVL (Tablas 3 y 4), se considera tener un buen conocimiento a un puntaje de 5/8 (>60%), en donde las respuestas “Sí” a las preguntas 1, 2, 5 suma un punto, al igual que las respuestas “No” a las preguntas 3, 4, 6, 7 y 8. Así, los resultados muestran que la mayoría de la población encuestada carece de un conocimiento adecuado sobre MVL.

Teniendo en cuenta las recomendaciones para el desarrollo de una automedicación responsable, el 59,9% de la población indica que usa Medicamentos de Venta Libre debido a que conoce el tratamiento de su malestar [24], además el 70,6% promueve una de las mejores prácticas relacionadas con la automedicación responsable, la cual consiste en leer el prospecto del medicamento, lo que en teoría garantiza el buen uso del medicamento [25]. Un dato curioso, es que la población no relaciona el concepto de “venta libre” con el uso de medicamentos sin necesidad de prescripción médica puesto que más del 83,5% de la población encuestada indica que es necesario una receta médica para adquirir MVL, este resultado también puede ser un indicador, que, pese a suponer que todos los medicamentos necesitan prescripción médica la población asume riesgos frente al tratamiento de sus dolencias, posiblemente debido a la falta de tiempo para asistir a citas médicas (64,9%) o relacionados con los costos de la asistencia médica (60,6%), este factor ha sido reportado por algunos estudios de automedicación [26, 27]. Otro factor importante a tener en cuenta es que más del 50% de la población asume que el uso de plantas medicinales o productos a base de plantas medicinales es 100% seguro, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Ortiz et al, lo cual es un factor de riesgo importante, debido a que el consumo de plantas medicinales puede generar interacciones medicamentosas con medicamentos de uso tradicional [28], además de la posibilidad de generar efectos adversos que pueden ser leves o muy graves [29, 30].

Uno de los resultados de mayor relevancia, en pro de la automedicación responsable es que 82,4% de la población encuestada reconoce el riesgo de los efectos adversos, por lo que son conscientes que una vez aparezcan como consecuencia de la administración de medicamentos esta debe suspenderse (93,4%), este concepto es respaldado por las respuestas negativas de tomar una dosis baja hasta que desaparezcan los efectos secundarios (74,0%) y que no se debe continuar tomando el medicamento independientemente de los efectos secundarios (88,2%).

Finalmente, otro comportamiento seguro frente a la práctica de la automedicación responsable es reconocer la importancia de no compartir o recomendar medicamentos de uso personal, demostrando que la población encuestada (74,2%) es consciente del riesgo que implica el consumo de medicamentos no prescritos o en su efecto sin un análisis pertinente.

Tabla 3. Conocimiento de la población colombiana sobre Medicamentos de Venta Libre.

Ítems (n=558)	Frecuencia (%)	
	Sí	No
Uso Medicamentos de Venta Libre porque sé cómo tratarme.	224 (40,1)	334 (59,9)
Leo el prospecto del medicamento antes de usar cualquier medicamento. (Prospecto: Papel impreso que acompaña a los medicamentos y que contiene información sobre su composición, características y modo de empleo.)	394 (70,6)	164 (29,4)
El Medicamento de Venta Libre necesita prescripción médica.	466 (83,5)	92 (16,5)
El uso de cualquier producto a base de plantas medicinales es seguro.	284 (50,9)	274 (49,1)
El uso de Medicamentos de Venta Libre puede causar efectos secundarios graves.	460 (82,4)	98 (17,6)
Si se sospechan efectos secundarios, se debe dejar de usar el medicamento inmediatamente.	521 (93,4)	37 (6,6)
Si se sospechan efectos secundarios, se debe tomar una dosis baja hasta que desaparezcan.	145 (26,0)	413 (74,0)
Si se sospechan efectos secundarios, se debe continuar tomando el medicamento independientemente de los efectos secundarios.	66 (11,8)	492 (88,2)

Al evaluar, la relación entre los factores sociodemográficos y las respuestas de la población encuestada se evidencia que las mujeres tienen además de una mejor aptitud, mejores conocimientos sobre los MVL, posiblemente se deba a que las mujeres presentan comportamientos más responsables en cuanto a consumo de medicamentos [31], sumado a que usualmente la madre es la responsable de la administración “por poderes” de medicamentos a niños, lo que podría conducir a un proceso más racional de automedicación bajo la premisa que la mujer propende a estar más informada [2]. Finalmente, los resultados demuestran, que la población de jóvenes encuestados suele tener conocimientos más escasos respecto a los MVL.

Tabla 4. Comparación entre participantes con buen o mal conocimiento sobre medicamentos de venta libre.

Ítems	Conocimiento (%)		RP; (IC 95%)*	p
	Bueno	Escaso		
Sexo				
Femenino	203 (36,3)	133 (23,8)	0,806; (0,668 – 0,973)	0,026
Masculino	109 (19,6)	113 (20,3)		

Ítems	Conocimiento (%)		RP; (IC 95%)*	p
	Bueno	Escaso		
Edad				
Adulto	126 (22,6)	138 (24,7)	1,21; (1,001 – 1,462)	0,049
Jóvenes	116 (20,8)	178 (31,9)		
Estado civil				
Casado/Unión libre	85 (15,2)	105 (18,8)	1,049; (0,860 – 1,278)	0,639
Soltero	157 (28,2)	211 (37,8)		
Ocupación (personal de salud)				
Si	46 (8,2)	60 (10,8)	1,001; (0,786 – 1,274)	0,995
No	196 (35,1)	256 (45,9)		
Régimen de salud			X ²	p
Contributivo	102 (18,3)	150 (26,9)	1,584	0,453
Subsidiado	119 (21,3)	142 (25,4)		
Recursos Propios	21 (3,8)	24 (4,3)		
Nivel socioeconómico				
Alto	10 (1,8)	13 (2,3)	0,220	0,896
Medio	172 (30,8)	230 (41,3)		
Bajo	60 (10,8)	73 (13,0)		
Nivel educativo				
Doctorado	4 (0,72)	4 (0,72)	9,863	0,196
Maestría o especialidad médica	26 (4,7)	31 (5,5)		
Especialista	30 (5,3)	25 (4,4)		
Profesional universitario	38 (6,9)	34 (6,0)		
Técnico – tecnólogo	16 (2,8)	22 (3,9)		
Estudiante universitario	117 (20,9)	176 (31,6)		
Secundaria	11 (1,9)	24 (4,3)		

*RP; (IC 95%): Razón de prevalencia; (Intervalo de confianza 95%).

+ X²: Chi²

CONCLUSIONES

La automedicación responsable es una práctica valorada, en cuanto a que además de contribuir con el manejo responsable de dolencias menores, podría ser un factor importante que permitiría descongestionar los servicios de atención médica, ofrecer mayor número de alternativas responsables para el tratamiento de afecciones menores y en relación con el costo de medicamentos, algunos expertos sugieren que reducirían. Los resultados del estudio muestran que la población encuestada, en general, no presenta una buena disposición al consumo de Medicamentos de Venta Libre y tiene un conocimiento escaso de los mismos, lo que podría generar comportamientos de medicación poco seguros debido a una automedicación no responsable, además creencias como suponer que todas las plantas medicinales son seguras o que la aparición de un efecto adverso leve no es suficiente motivo para detener el tratamiento con un MVL, acarreando problemas graves de salud en los individuos, con implicaciones en la salud pública. Sumado a lo anterior, la influencia del empleado del establecimiento farmacéutico en la toma de decisiones del paciente, puede llevar a ocurrencia de RAM o interacciones medicamentosas peligrosas, debido a que el empleado no cuenta ni con la formación profesional ni con la autoridad legal que le permita intervenir en el tratamiento del individuo. Finalmente, es importante reconocer, que a partir de los resultados se evidencia la importancia de fomentar capacitaciones, campañas y/o programas que conduzcan al uso adecuado y seguro de MVL.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. A. Baumelou, S. Lauraire, S. Tachot, M. Flachaire, Automedicación, *EMC – Tratado de Medicina*, **11**(1), 1–3 (2007). Doi: [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(07\)70648-7](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(07)70648-7)
2. M. Valenzuela-Ortiz, F.J. Sánchez-Ruiz-Cabello, J. Uberos, A.F. Checa-Ros, C. Valenzuela-Ortiz, M.C. Agustín-Morales, A. Muñoz-Hoyos, Automedicación, autoprescripción y medicación «por poderes» en pediatría, *Anales de Pediatría*, **86**(5), 264–269 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2016.06.002>

3. D. Ramírez-Puerta, O. Larrubia-Muñoz, E. Escortell-Mayor, R. Martínez-Martínez, La automedicación responsable, la publicidad farmacéutica y su marco en la Atención Primaria, *SEMERGEN – Medicina de Familia*, **32**(3), 117–124 (2006). Doi: [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(06\)73235-X](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(06)73235-X)
4. J.J. López, R. Dennis, S.M. Moscoso, Estudio sobre la automedicación en una localidad de Bogotá, *Revista de Salud Pública*, **11**(3), 432–442 (2009). URL: <https://scielosp.org/pdf/rsap/2009.v11n3/432-442/es>
5. F.A. Tobón-Marulanda, Estudio sobre automedicación en la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, *Iatreia*, **15**(4), 242–247 (2002). URL: <http://scielo.org.co/pdf/iat/v15n4/v15n4a3.pdf>
6. C.P. Ortiz, O.D. Fúnez-David, H. Rubiano-Daza, C.L. García-Rojas, C.A. Calderón-Ospina, D.R. Delgado, Automedicación en estudiantes de la Sede Neiva de la Universidad Cooperativa de Colombia, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **48**(1), 128–144 (2019). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n1.80070>
7. R. Pastor-Sánchez, Alteraciones del nicho ecológico: resistencias bacterianas a los antibióticos, *Gaceta Sanitaria*, **20**(Supl. 1), 175–181 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1157/13086041>
8. R.D. Camargo-Rubio, Bioética prescripción antibiótica y resistencia bacteriana, *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*, **23**(4), 363–369 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.acci.2023.04.010>
9. M.J. Nino-Orrego, D. Baracaldo-Santamaría, C.P. Ortiz, H.P. Zuluaga, S.A. Cruz-Becerra, F. Soler, A.M. Pérez-Acosta, D.R. Delgado, C.A. Calderon-Ospina, Prescription for COVID-19 by non-medical professionals during the pandemic in Colombia: A cross-sectional study, *Therapeutic Advances in Drug Safety*, **13**, 1–12 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1177/20420986221101964>
10. C.A. López-Cabra, J.M. Gálvez-Bermúdez, C. Domínguez-Domínguez, A.d.P. Urbina-Bonilla, C.A. Calderón-Ospina, Á. Vallejos-Narváez, Automedicación en estudiantes de medicina de la Universidad del Rosario en Bogotá D. C., Colombia, *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, **45**(3), 374–384 (2016). URL: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182016000300003

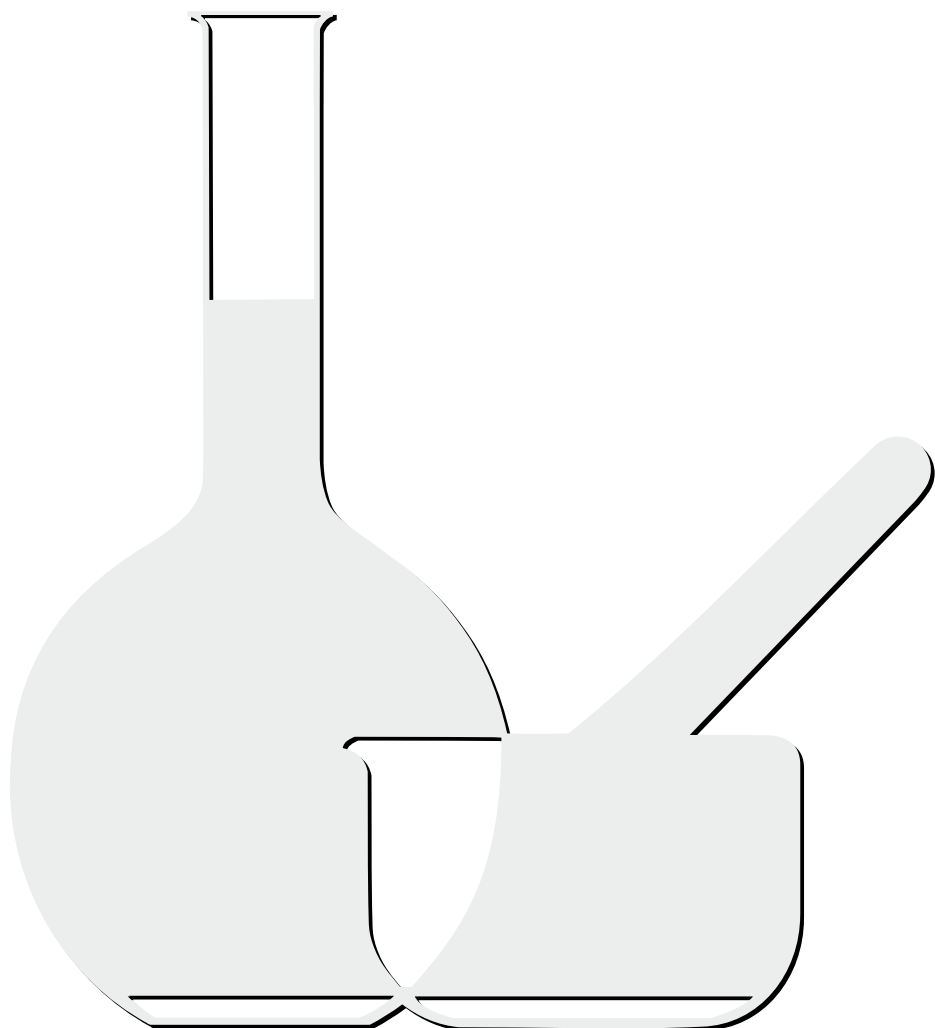
11. M.d.T. Rubio, A. Díaz-Pérez, Z.A. Barrios-Puesta, I.Y. Castillo-Ávila, Auto-medicación y creencias en torno a su práctica en Cartagena, Colombia, *Revista Cuidarte*, **8**(1), 1509–1518 (2017). URL: <https://www.redalyc.org/pdf/3595/359549159010.pdf>
12. J. Castro-Espinosa, J.F. Arboleda-Geovo, P.A. Samboni-Novoa, Prevalencia y determinantes de automedicación con antibióticos en una comuna de Santiago de Cali, Colombia, *Revista Cubana de Farmacia*, **48**(1), 43–54 (2014). URL: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubfar/rcf-2014/rcf141f.pdf>
13. F. Villegas-Cardona, K.M. Nasner-Posso, D.P. Buitrago-Gómez, S. Cruz-Calderón, S. Ruden-Restrepo, J.E. Bedoya-Arias, A.F. Barco-Álvarez, E.S. Bolaños-Muñoz, R. Gómez-Ossa, Patrón de automedicación en la zona urbana de la ciudad de Pereira (Colombia) en el trimestre marzo- mayo 2013, *Investigaciones Andina*, **16**(19), 1073–1085 (2014). URL: <https://www.redalyc.org/pdf/2390/239031678006.pdf>
14. P. Rathod, S. Sharma, U. Ukey, B. Sonpimpale, S. Ughade, U. Narlawar, S. Gaikwad, P. Nair, P. Masram, S. Pandey, Prevalence, pattern, and reasons for self-medication: A community-based cross-sectional study from Central India, *Cureus*, **15**(1), e33917 (2023). Doi: <https://doi.org/10.7759/cureus.33917>
15. S.B. Loni, R.E. Alzahrani, M. Alzahrani, M.O. Khan, R. Khatoon, H.H. Abdelrahman, Z.A. Abd-Elhaleem, M.M. Alhaidari, Prevalence of self-medication and associated factors among female students of health science colleges at Majmaah University: A cross-sectional study, *Frontiers in Public Health*, **11**, 1090021 (2023). Doi: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1090021>
16. I.A. Malli, R.A. Hubayni, A.M. Marie, D.Y. Alzahrani, E.I. Khshwry, R.A. Aldahas, R.F. Khan, S.F. Zaidi, The prevalence of self-medication and its associated factors among college students: Cross-sectional study from Saudi Arabia, *Preventive Medicine Reports*, **36**, 102457(2023). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2023.102457>
17. M.E. Darden, N.W. Papageorge, Rational self-medication, *Economics & Human Biology*, **53**, 101350 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ehb.2024.101350>
18. A. Nemat, K.J. Rezayee, M.Y. Essar, W.b. Mowlabaccus, S. Ahmad, M.Y. Mubarak, A report of Kabul internet users on self-medication with over-the-counter medicines, *Scientific Reports*, **13**, 8500 (2023). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35757-6>

19. República de Colombia, Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), Demografía y población. URL: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion>, accesado el 26 de septiembre de 2023.
20. República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social, Fases y Etapas, 2024. URL: <https://www.minsalud.gov.co/plandecenal/Paginas/fases-y-etapas.aspx>, accesado el 28 de enero de 2024.
21. A. Aguzzi, C. Virga, Uso racional de medicamentos: La automedicación como consecuencia de la publicidad, *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, **28**(1), 28–30 (2009). URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55911661006>
22. A.T. Ching, R. Clark, I. Horstmann, H. Lim, The effects of publicity on demand: The case of anti-cholesterol drugs, *Marketing Science*, **35**(1), 158–181 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1287/mksc.2015.0925>
23. M. Ansari, Sociobehavioral aspects of medicines use in developing countries, en: M.I.M. Ibrahim, A.I. Wertheimer, Z.-U.-D. Babar (editors), *Social and Administrative Aspects of Pharmacy in Low-and Middle-Income Countries: Present Challenges and Future Solutions*, Academic Press, 2018. pp. 15–33. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811228-1.00002-9>
24. D. Galato, L.D.M. Galafassi, G.M. Alano, S.C. Trauthman, Responsible self-medication: Review of the process of pharmaceutical attendance, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **45**(4), 625–633 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000400004>
25. R. Stosic, F. Dunagan, H. Palmer, T. Fowler, I. Adams, Responsible self-medication: Perceived risks and benefits of over-the-counter analgesic use, *International Journal of Pharmacy Practice*, **19**(4), 236–245 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1111/J.2042-7174.2011.00097.X>
26. D. Bennadi, Self-medication: A current challenge, *Journal of Basic Clinical Pharmacy*, **5**(1), 19–23 (2014). URL: <https://www.jbclinpharm.org/articles/selfmedication-a-current-challenge.pdf>

27. R. Hermoza-Moquillaza, C. Loza-Munarriz, D. Rodríguez-Hurtado, C. Arellano-Sacramento, V. Hermoza-Moquillaza, Automedicación en un distrito de Lima Metropolitana, Perú, *Revista Médica Herediana*, **27**(1), 15–21 (2016). URL: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2016000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
28. J. Sanfélix-Genovés, V. Palop-Larrea, E. Rubio-Gomis, I. Martínez-Mir, Consumo de hierbas medicinales y medicamentos, *Atención Primaria*, **28**(5), 311–314 (2001). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(01\)70381-2](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(01)70381-2)
29. A.B. Pliego, M. Tavakoli, A. Khusro, A. Seidavi, M.M.M.Y. Elghandour, A.Z.M. Salem, O. Márquez-Molina, R.R. Rivas-Caceres, Beneficial and adverse effects of medicinal plants as feed supplements in poultry nutrition: A review, *Animal Biotechnology*, **33**(2), 369–391 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1798973>
30. L.M. Gupta, R. Raina, Side effects of some medicinal plants, *Current Science*, **75**(9), 897–900 (1998). URL: <https://www.jstor.org/stable/24101663>
31. M.J. Cecilia, J. García-Estañ, N.M. Atucha, La automedicación en estudiantes del Grado en Farmacia, *Educación Médica*, **19**(5), 277–282 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.edumed.2017.07.005>

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M.A. Yucuma-Guzmán, J.D. Castañeda-Muñoz, F. Angarita-Reina, C.L. García-Rojas, H. Rubiano-Daza, Aptitud y conocimiento sobre Medicamentos de Venta Libre en Colombia: un análisis de la automedicación responsable, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 266-281 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.111424>



NORMAS PARA PUBLICACIÓN

La Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas es editada por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá), con una periodicidad cuatrimestral y tiene como objetivo publicar artículos originales de diversos tópicos relacionados con las ciencias farmacéuticas como recursos naturales, atención farmacéutica, evaluación clínica y preclínica, y los relacionados con la industria farmacéutica, la salud y los medicamentos.

Además de artículos completos, la revista acepta revisiones, comunicaciones breves y cartas al Editor. Las contribuciones pueden enviarse en español, portugués o inglés, en letra Times New Roman, tamaño 12, al correo electrónico rcci-quifa_fcbog@unal.edu.co o a través del sistema OJS en el sitio web: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcci-quifa>.

Todo el material propuesto para publicación será revisado por el Comité Editorial, y luego de su aceptación para evaluación, será sometido a revisión por pares académicos. Las evaluaciones recibidas por el Comité Editorial serán remitidas al autor para que se realicen los ajustes sugeridos. Los autores tendrán un lapso de tres semanas para responder cada una de las observaciones, introducir en el texto las modificaciones del caso y retornar el documento corregido al Comité Editorial. Después de que los evaluadores o el Comité Editorial lleven a cabo

una segunda revisión del manuscrito, la revista comunicará a los autores la decisión sobre la publicación o no del mismo. Los manuscritos deberán acompañarse de una carta firmada por todos los autores en la cual se declare que el trabajo es inédito; es decir, que el artículo ni parte de este ha sido publicado o está en vía de publicación en otra revista, y en la que se responsabilizan por la información publicada. Se entiende claramente que los trabajos enviados no están siendo considerados para su publicación en otros medios.

Criterios para la presentación de manuscritos

- La fuente de los manuscritos debe ser Times New Roman tamaño 12.
- No se admiten notas a pie de página.
- Título, centrado y en minúscula.
- Autor(es) con su respectiva filiación institucional y correo electrónico del autor principal.
- Resumen, *Summary* o Resumen. Incluye la justificación del estudio y los principales hallazgos y conclusiones, debe tener entre 50 y 200 palabras. Se debe incluir el título del artículo y el resumen en inglés (*Summary*) independiente del idioma del manuscrito.
- *Key words* (debajo de *Summary*) y Palabras clave (debajo del Resumen) o Palabras chave (debajo de Resumen). De tres a seis palabras en minúscula, excepto la primera, y separadas por coma y espacio. Preferiblemente tomadas del Index

Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>).

- En los manuscritos en español y portugués se empleará la coma (,) como separador decimal, en inglés se utilizará el punto (.).
- Los artículos se dividirán en las siguientes secciones: Introducción, Metodología, Resultados y Discusión, Conclusiones (si las hay), Agradecimientos, Conflicto de intereses y Referencias. Los títulos deben estar separados por dos espacios en sus partes superior e inferior, centrados y en negrilla. Los detalles acerca de la metodología experimental utilizada deberán ser lo suficientemente claros como para repetir la experimentación.
- Las tablas deben llevar numeración arábica de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir en su parte superior y las notas en la parte inferior. En los encabezamientos de las columnas se deben anotar los símbolos de las unidades utilizadas.
- Las fotografías, gráficas, dibujos y esquemas se denominan 'figuras' y deben llevar numeración arábica de acuerdo con el orden de aparición en el texto. El título debe ir debajo de las figuras.

De otro lado, los artículos relacionados con experimentación con animales deben ajustarse plenamente a los lineamientos éticos trazados por la Organización Mundial de la Salud. Los extractos o fracciones evaluados *in vitro* o *in vivo* deben definirse químicamente, cuando menos en cuanto a la

clase de constituyente. El material vegetal deberá estar clasificado botánicamente.

Las abreviaturas de pesos y medidas serán las indicadas por la Farmacopea de los Estados Unidos en su edición oficial o unidades SI. Los datos espectroscópicos se deben presentar de la siguiente manera:

UV λ max (solvente ϵ) nm (log ϵ). Ej.: UV λ max (MeOH) 275 (log ϵ 2,94).

IR ν max (medio) cm^{-1} . Ej.: IR ν max (KBr) 1740, 1720 cm^{-1} .

EM m/z (% intensidad relativa). Ej.: em m/z (%): 340 (M^+ , 100), 295 (10), 134 (26) ...

RMN ^1H (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (integración, multiplicidad, J en Hz, asignación). Ej.: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) 3,84 (1H, *d*, J = 10,3 Hz, H-30).

RMN ^{13}C (solvente, frecuencia de registro) δ ppm (multiplicidad, asignación). Ej.: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) 16,60 (t, C-12).

Las abreviaturas usadas para describir la multiplicidad de las señales en RMN son: *s* = singlete, *d* = doblete, *t* = triplete, *m* = multiplete, *dd* = doble de dobletes, *ddd* = doble de doble de dobletes.

Las abreviaturas para los solventes y reactivos más comúnmente usados son: EtOH = etanol, MeOH = metanol, CHCl_3 = cloroformo, C_6H_6 = benceno, AcOEt = acetato de etilo, EP = éter de petróleo, Me_2CO = acetona, DMSO = dimetilsulfóxido, AcOH = ácido acético.

Se evitará el uso excesivo de tablas y figuras que estarán numeradas y que se anexarán en hojas separadas con su respectiva descripción

Referencias de los manuscritos

Las referencias se citarán en el texto con su respectiva numeración. Solo se pueden citar tesis y libros o artículos que hayan sido publicados. Deben incluir: autor(es), título de la publicación, año, volumen y páginas, así:

Revistas: Iniciales del nombre y apellido completo de todos los autores, título completo del artículo, nombre abreviado o nombre completo de la revista dependiendo si aparece en el Chemical Abstract o en índices equivalentes. El nombre de la revista debe ir en letra *itálica*, **volumen en negrilla**, páginas inicial y final, y año entre paréntesis. Ej.:

1. H.P. Baden, L.A. Goldsmith, B. Fleming, A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues, *Bioch. Biophys. Acta*, **322**, 269-278 (1973).

Comunicaciones personales: Iniciales del nombre, apellido completo e institución, seguido por las palabras comunicación personal y el año. Ej.:

2. A.J.M. Leeuwenberg, Agricultural University, Wageningen, Holanda, comunicación personal, 1984.

Libros: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, título del libro

entre comillas, editorial, ciudad, año, volumen y página. Ej.:

3. D.R. Morris, "The Biochemistry of Disease", Morris et Marton Eds., London, 1981, Vol. 8, p. 223.

Capítulos de libros escritos por varios autores: Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del capítulo, seguido de: En: título del libro entre comillas, editores, editorial, ciudad, año, volumen, páginas. Ej.:

4. A.D. Elbein, R.J. Molyneux, The chemistry and biochemistry of simple indolizidine and related polyhydroxy alkaloids. En: "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. por S.W. Pelletier, Wiley, New York, 1987, Vol. 5, pp. 1-54.

Tesis: Iniciales del nombre y apellido completo de los autores, *título en cursiva*, Tesis de..., institución, ciudad, año, páginas. Ej.:

5. F. Salcedo, *Contribución al estudio de las Cinchonas colombianas*, Tesis de Grado, Universidad del Valle, Cali, 1983, pp. 14-16.

Referencias de Internet: Iniciales del nombre y apellido completo del autor, título del documento, dirección URL y fecha de revisión. Ej.:

6. Lipidat, Lipid thermotropic phase transition database, Ohio State University, URL: <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, consultado en septiembre de 2001.

La correspondencia puede enviarse a la siguiente dirección o al correo de la revista rcciquifa_fcbog@unal.edu.co

Comité Editorial

Revista Colombiana de Ciencias
Químico-Farmacéuticas
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Cra. 30 N.º 45-03
Fax: 57-1-3165060

Bogotá - Colombia
Correo electrónico:
rcciquifa_fcbog@unal.edu.co

Dirección WEB:
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcciquifa>

*Revista Colombiana
de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 53(1)*
se terminó de editar en Proeditor,
en abril de 2024.
Bogotá, D. C., Colombia.

